



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0612720-7 A2**

(22) Data de Depósito: 28/06/2006
(43) Data da Publicação: 15/02/2011
(RPI 2093)



(51) *Int.Cl.:*
B01J 20/30
B01J 20/24
B01J 20/291
C08B 37/12

(54) Título: **MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UMA MATRIZ DE SEPARAÇÃO, MATRIZ DE SEPARAÇÃO DE POLISSACARÍDEO RETICULADO, COLUNA DE CROMATOGRAFIA, E, USO DE UMA MATRIZ DE SEPARAÇÃO**

(30) Prioridade Unionista: 06/07/2005 SE 0501609-2,
24/10/2005 SE 0502373-4

(73) Titular(es): GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB

(72) Inventor(es): Anders Hagvall, Anders Larsson, Dag Lindström,
David Buckley, Eva Holmgren, Hans Berg, Henrik Ihre, Maria Birgitta
Holm, Philippe Busson

(74) Procurador(es): MOMSEN, LEONARDOS & CIA

(86) Pedido Internacional: PCT SE2006000790 de 28/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/004947 de 11/01/2007

(57) Resumo: METODO DE PREPARAÇÃO DE UMA MATRIZ DE SEPARAÇÃO, MATRIZ DE SEPARAÇÃO DE POLISSACARÍDEO RETICULADO, COLUNA DE CROMATOGRAFIA, E, USO DE UMA MATRIZ DE SEPARAÇÃO A presente invenção diz respeito a um método de preparação de uma matriz de separação insolúvel, cujo método compreende tratamento de sal de um gel de polissacarídeo seguido pela reticulação dos polímeros de polissacarídeo. Em uma forma de realização, o método compreende fornecer uma solução aquosa de um polissacarídeo nativo gelificável; diminuir a temperatura da solução de polissacarídeo para um valor abaixo de seu ponto de gelação; tratamento de sal mediante a adição de pelo menos um sal ao polissacarídeo resultante; e reticular o polissacarídeo tratado com sal. O polissacarídeo pode ser preparado, por exemplo, em partículas, membranas ou monolitos.

“MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UMA MATRIZ DE SEPARAÇÃO, MATRIZ DE SEPARAÇÃO DE POLISSACARÍDEO RETICULADO, COLUNA DE CROMATOGRAFIA, E, USO DE UMA MATRIZ DE SEPARAÇÃO”

5 Campo Técnico

A presente invenção diz respeito à separação e purificação de moléculas alvos, tais como biomoléculas, e mais especificamente a uma matriz de cromatografia e um novo método para a sua preparação. A invenção também abrange o uso de uma tal matriz na cromatografia líquida, e uma
10 coluna de cromatografia que compreende a matriz.

Fundamentos

Os recentes avanços no campo da biotecnologia têm requerido técnicas mais seguras e mais precisas para recuperação, purificação e análise de substâncias biológicas e bioquímicas, tais como proteínas. A cromatografia
15 é uma técnica de purificação comumente usada no campo. Na cromatografia, duas fases mutuamente imiscíveis são colocadas em contato. Mais especificamente, a molécula alvo é introduzida em uma fase móvel, que é colocada em contato com uma fase estacionária. A molécula alvo depois passará por uma série de interações entre as fases estacionárias e móveis
20 como se estivesse sendo carregada através do sistema pela fase móvel. As interações exploram as diferenças nas propriedades físicas ou químicas dos componentes na amostra. Na cromatografia líquida, uma amostra líquida, opcionalmente combinada com um tampão adequado constitui a fase móvel, que é colocada em contato com uma fase estacionária, conhecida como uma
25 matriz de separação. Geralmente, a matriz compreende um suporte para que os ligandos, que são grupos capazes de interações com o alvo, fossem acoplados.

As matrizes de separação comumente se baseiam nos suportes produzidos a partir de materiais inorgânicos, tais como sílica, ou materiais

orgânicos, tais como polímeros sintéticos ou naturais. Os polímeros sintéticos, tais como estireno e divinilbenzeno, são freqüentemente usados para suportes que apresentam alguma hidrofobicidade, tais como cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e cromatografia de fase reversa (RPC). Além disso, os polímeros sintéticos são às vezes preferidos sobre os polímeros naturais, porque eles são facilmente produzidos mais rígidos e resistentes a pressão, resultando em suportes que fornecem propriedades de fluxo mais vantajosas.

Os polímeros naturais, que são comumente polissacarídeos tais como agarose, têm sido utilizados como suportes de matrizes de separação durante décadas. Devido à presença de grupos de hidroxila, as superfícies dos polímeros naturais são geralmente hidrófilos, não fornecendo essencialmente nenhuma interação não específica com as proteínas. Uma outra vantagem dos polímeros naturais, que é de importância específica na purificação de medicamentos ou moléculas de diagnóstico para uso humano interno, é suas propriedades não tóxicas. Agarose pode ser dissolvida na água em temperatura aumentada, e depois formará um gel poroso após esfriamento para uma certa temperatura (o ponto de gelação). Durante o aquecimento, o gel fundirá novamente em uma temperatura (o ponto de fusão), que é geralmente muito mais elevada do que o ponto de gelificação. A gelificação envolve a agregação hélice-hélice dos polímeros de polissacarídeo, e é algumas vezes referida como uma reticulação física.

Como mencionado acima, os polímeros naturais são menos rígidos e resistentes a pressão do que os polímeros sintéticos, e conseqüentemente métodos têm sido desenvolvidos para a sua melhorar. Por exemplo, mediante a variação da concentração de polissacarídeo, a porosidade do suporte pode ser aumentada, resultando em transporte de massa direcionado melhorado e aumento da área com o qual o alvo interage durante a cromatografia. Um outro parâmetro essencial a considerar é as propriedades

de fluxo do suporte, por exemplo, em um leito condensado de matriz de separação particulada. Quando a fase móvel for forçada através do leito, a pressão de retorno principalmente será controlada pelas canais intersticiais entre as partículas. Em vazões baixas, as partículas podem ser consideradas
5 como incompressíveis e depois a pressão de retorno aumenta linearmente com a vazão, com a inclinação dependente do tamanho de partícula. Quando a vazão aumenta, as partículas podem começar a deformar sob pressão hidrostática, resultando na diminuição dos diâmetros dos canais intersticiais e uma pressão de retorno rapidamente crescente. Em uma certa vazão,
10 dependendo da rigidez da matriz, o leito cairá em colapso e a pressão de retorno se aproximará do infinito.

O meio mais comumente usado para melhorar a rigidez e consequentemente as propriedades de fluxo de agarose é a sua reticulação química. Tal reticulação ocorre entre os grupos de hidroxila disponíveis, e
15 pode ser obtida por métodos comumente conhecidos usando, por exemplo, epicloroidrina.

A US 4.973.683 (Lindgren) diz respeito à reticulação de géis de polissacarídeo porosos, e mais especificamente a um método de melhorar a rigidez enquanto minimiza a interação não específica de um gel de
20 polissacarídeo poroso. O método envolve fornecer um gel de agarose e um reagente designado “monofuncional”, que compreende um grupo reativo, tal como um grupo de halogênio ou um grupo de epóxido, e uma ligação dupla. O reagente é ligado ao gel através de seu grupo reativo; e a ligação dupla é depois ativada em um epóxido ou haloidrina, que é finalmente reagida com
25 grupos de hidroxila na agarose para fornecer reticulação.

A US 5.135.650 (Hjertén et al) diz respeito às partículas de fase estacionária cromatográficas altamente compressíveis, tais como glóbulos de agarose, que são mencionadas de ser suficientemente rígidas para HPLC e não porosas na medida em que elas são impenetráveis por solutos.

Mais especificamente, os glóbulos de Hjertén são produzidos de glóbulos de agarose porosos, que são colocados em contato com um solvente orgânico para a porosidade cair em colapso, após o que as superfícies do glóbulo dentro dos poros desfalecidos são reticulados para fixar os poros em seu estado desfalecido. Alternativamente, os glóbulos são produzidos mediante o enchimento dos poros com uma substância polimerizável, que enxerta nas superfícies do poro, e execução da polimerização de enxertia. Uma vantagem mencionada da invenção divulgada é que uma fase estacionária única é eficaz em pressões elevadas e ainda pode ser usada em pressões baixas. No entanto, o uso de solventes, especialmente tais solventes como usados nesta patente, é em geral evitada por razões de saúde e segurança.

A US 6.602.990 (Berg) se refere a um processo para a produção de um gel de polissacarídeo reticulado poroso, em que um agente de reticulação bifuncional é adicionado a uma solução de polissacarídeo e deixado se ligar através de seu sítio ativo aos grupos de hidroxila do polissacarídeo. Um gel de polissacarídeo é depois formado a partir da solução, após o que o sítio inativo do agente de reticulação é ativado e a reticulação do gel executada. Assim, o agente de reticulação é introduzido na solução de polissacarídeo, ao contrário dos métodos debatidos acima em que é adicionado a um gel de polissacarídeo. O agente de reticulação bifuncional compreende um sítio ativo, isto é, um sítio capaz de reação com os grupos de hidroxila do polissacarídeo, tais como haletos e epóxidos, e um sítio inativo, isto é, um grupo que não reage sob as condições onde o sítio ativo reage, tal como grupos de alila. Assim, o agente de reticulação bifuncional presente corresponde aos “reagentes monofuncionais” usados de acordo com a US 4.973.683 (Lindgren) examinada acima. As partículas compreendidas do gel resultante foram mostradas de apresentar uma capacidade melhorada de suportar vazões e pressões de retorno elevadas. Uma desvantagem com o método da US 6.602.990 é que bromo é requerido para a ativação do agente

de reticulação.

A US 5.998.606 (Grandics) diz respeito a um método de sintetização das matrizes de cromatografia, em que a reticulação e a funcionalização de uma matriz ocorrem simultaneamente. Mais especificamente, as ligações duplas fornecidas na superfície de uma matriz de carboidrato polimérica são ativadas na presença de um catalisador metálico para reticular a matriz e funcionalizá-la com grupos de haloidrina, carboxila ou sulfonato. As ligações duplas são fornecidas na superfície da matriz mediante o contato com um reagente de ativação, que contém um átomo de halogênio ou epóxido e uma ligação dupla. Assim, o reagente de ativação da US 5.998.606 corresponde ao reagente monofuncional da US 4.973.683 e o agente de reticulação bifuncional da US 6.602.990.

Qi et al (Journal of Functional Polymers, Vol. 13, March 2000: "Preparation of Two Types of Immobilized Metal-Chelated Complex Affinity Membrane Chromatography Media") descreve como as membranas de afinidade de celulose macro-porosas são produzidas usando papel de filtro de celulose como a matriz, em atividade através do tratamento alcalino, ativação da epoxidação, acoplamento com iminodiacetato de dissódio, e imobilização de Cu^{2+} . Além disso, a agarose foi covalentemente reticulada nas membranas de pós-ativação para produzir as membranas que possuem uma estrutura semelhante a sanduíche.

A US 2005/0220982 (Moya et al) diz respeito a um método de formação de estruturas de polissacarídeo tais como glóbulos, películas de gel e revestimentos porosos sobre substratos porosos mediante a formação de uma solução inibida por gel em temperatura ambiente de um polissacarídeo, um ou mais agente(s) de inibição de gel e um solvente tal como água, aquecimento da mistura até que todos os componentes sejam dissolvidos, esfriamento da mistura como uma solução ao redor da temperatura ambiente, formação de uma estrutura tridimensional com a solução e adição da estrutura

a um agente de gelação para formar um gel de polissacarídeo. O agente de inibição do gel, por exemplo, baseia-se em sais de zinco, lítio ou sódio. O revestimento de polissacarídeo é determinado de ser espesso o bastante para permitir o fluxo difusivo ocorrer dentro da própria camada de polissacarídeo.

- 5 Uma vantagem mencionada do método descrito é que as estruturas são formadas em temperatura ambiente e com gelação controlada do polímero com os polímeros de polissacarídeo que normalmente formam gel bem acima da temperatura ambiente. É também mencionado que o revestimento das superfícies é obtido sem substancialmente bloquear os poros com o
- 10 polissacarídeo. Entretanto, tal operação em temperatura ambiente exigirá controle cuidadoso da solução de agarose, que torna o processo total relativamente demorado.

Desta maneira, mesmo embora técnicas estejam disponíveis para a produção de matrizes de separação de polissacarídeo reticuladas,

15 diferentes aplicações futuras propõem diferentes requisitos sobre a matriz, resultando em uma necessidade contínua de métodos alternativos.

Breve descrição da invenção

Um aspecto da presente invenção é fornecer um método para a preparação de uma matriz de separação de polissacarídeo, em que a matriz

20 apresenta propriedades de fluxo adequadas para o processamento em grande escala. Isto pode ser obtido mediante a preparação de uma matriz de separação como definido nas reivindicações anexas.

Um aspecto específico da presente invenção é fornecer um método para a preparação de uma matriz de separação de polissacarídeo

25 particulada, que permite a reticulação com risco reduzido de agregação. Isto pode ser alcançado por uma matriz de separação preparada como definido nas reivindicações anexas, que podem ser reticuladas em temperaturas mais elevadas do que convencionalmente usadas.

Um aspecto específico da presente invenção é fornecer um

método que permite a fabricação de uma matriz de separação porosa de rigidez melhorada sem cair em colapso a estrutura de poro. Isto pode ser obtido usando o método definido nas reivindicações anexas para preparar uma matriz de separação, o tamanho de poro da qual permite as moléculas alvos entrar nos poros. Este aspecto é vantajoso para a purificação e/ou isolamento de moléculas alvos relativamente pequenas, tais como proteínas, em vazões aumentadas.

Outros aspectos e vantagens da presente invenção surgirão a partir da descrição detalhada que se segue.

10 Definições

O termo matriz de separação “particulada” significa aqui uma matriz de separação compreendida de partículas, tais como partículas essencialmente esféricas ou partículas menos regularmente moldadas.

15 O “ponto de gelação”, às vezes aqui indicado como “temperatura de gelação” significa a temperatura em que os polímeros de uma solução interagem fisicamente para formar um gel sólido.

O termo “gelificável” significa aqui capaz de formar um gel físico.

20 O termo polissacarídeo “nativo” se refere a um polissacarídeo em um estado não modificado, isto é, um polissacarídeo que não foi substituído ou derivado.

25 O termo “matriz” de separação aqui contido significa um material compreendido de um suporte sólido poroso ou não poroso, a qual os ligandos foram ligados. No campo de cromatografia, a matriz de separação é às vezes significada resina ou meio.

O termo “ligandos” é aqui usado em seu significado convencional, isto é, para entidades químicas que são capazes de interagir com uma molécula alvo, tais como grupos carregados capazes de interagir com uma molécula alvo opostamente carregada em um processo de troca de

íon. K_{av} é um parâmetro de filtração de gel (cromatografia de exclusão de tamanho) definido como $(V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, onde V_e é o volume de eluição do pico de molécula de teste, V_0 é o volume vazio da coluna e V_t é o volume de leito total. K_{av} é uma medida da fração do volume de fase estacionária acessível à molécula de teste particular.

$K_{av\ DX}$ é K_{AV} para moléculas de dextrano. Nos exemplos, dextranos de peso molecular 110 kD, 500 kD e 1000 kD, respectivamente, foram usados.

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção se refere a um método de preparação de uma matriz de separação insolúvel, tal como partículas, um monolito ou uma membrana, mediante o tratamento de sal de um gel de polissacarídeo seguido por reticulação dos polímeros de polissacarídeo. O método pode incluir uma etapa precedente de fornecer o gel de polissacarídeo de uma solução desta, preferivelmente mediante a diminuição de sua temperatura. O gel pode ser fornecido como um portador de membrana; como partículas de polissacarídeo; ou como um revestimento sobre as partículas produzidas a partir de um material diferente. O gel é vantajosamente poroso.

Assim, em um primeiro aspecto, a presente invenção se refere a um método de preparação de uma matriz de separação, cujo método compreende as etapas de

- (a) fornecimento de uma suspensão aquosa de partículas compreendidas de polissacarídeo nativo em forma de gel;
- (b) tratamento de sal das partículas colocadas em suspensão mediante a adição de pelo menos um sal; e
- (c) reticulação das partículas tratadas com sal.

O polissacarídeo pode ser qualquer polissacarídeo capaz de forma um gel, preferivelmente mediante uma mudança de temperatura, e pode ser selecionado do grupo consistindo de agarose, ágar, celulose, dextrano,

amido, quitosana, konjac, curdlan, carragenano, pectina, gellan e alginato. Como a pessoa versada compreenderá, tais partículas de polissacarídeo em forma de gel são vantajosamente compreendidas de um polissacarídeo, mas a presente invenção também abrange o uso de partículas compreendidas de uma
5 mistura de dois ou mais polissacarídeos. Em uma forma de realização vantajosa do presente método, o polissacarídeo é agarose. Em um método específico, um núcleo ou portador de partícula é revestido com um polissacarídeo como descrito acima. O portador pode ser como debatido abaixo no contexto do portador de membrana.

10 Como se mostra do acima, de acordo com a presente invenção, as partículas de polissacarídeo fornecidas na etapa (a) são compreendidas de polissacarídeo nativo, isto é, um polissacarídeo cujos polímeros não foram submetidos a qualquer modificação ou substituição tais como derivação ou reticulação. Assim, a presente invenção adiciona sais ao polissacarídeo não
15 modificado.

Em uma forma de realização vantajosa, as partículas de polissacarídeo são essencialmente partículas esféricas (contas). No campo de cromatografia, o tamanho de partícula é comumente dado como o tamanho de partícula mediano da distribuição de volume cumulativa. No presente método,
20 o tamanho médio dos glóbulos pode estar em uma faixa de 10 a 300 μm , preferivelmente de 30 a 200 μm ou mais preferivelmente de 45 a 165 μm , tal como cerca de 45 μm , de diâmetro.

Tais contas de polissacarídeo são facilmente preparadas pela pessoa versada neste campo de acordo com os métodos padrão, tais como
25 gelificação de suspensão inversa (S Hjertén: Biochim Biophys Acta 79(2), 393-398 (1964). Por exemplo, quando se prepara agarose, gotículas de agarose são obtidas pela dissolução ou dispersão da agarose em um solvente aquoso, tal como água, ou qualquer outro solvente comumente usado, em uma temperatura acima de seu ponto de fusão. A agarose dissolvida é depois

emulsificada em um solvente orgânico comumente usado tal como tolueno ou heptano com agitação, após o que a temperatura é reduzida para baixo do ponto de gelação da agarose, convenientemente para a temperatura ambiente. No presente método, os glóbulos assim produzidos são vantajosamente lavados para remover qualquer traço de solvente, por exemplo, com etanol ou água, e colocados em suspensão em água ou uma solução aquosa adequada. Assim, em uma forma de realização vantajosa, as partículas são lavadas antes da etapa de reticulação.

Como entendido pela pessoa versada neste campo, existem outros métodos de preparação da suspensão aquosa de partículas de polissacarídeo do que a emulsão. Assim, em uma forma de realização alternativa, as partículas de polissacarídeo são obtidas mediante a pulverização de uma composição, que é compreendida de um polissacarídeo termicamente gelificável em um meio aquoso, em ar ambiente e deixando a composição atomizada formar gel no ar, como divulgado, por exemplo, na US 6.248.268 (FMC Corporation), que é por meio desta aqui incorporado através de referência.

Em uma forma de realização alternativa, as partículas de polissacarídeo são irregularmente moldadas, tais como obteníveis, por exemplo, simplesmente pela preparação de um segmento grande de polissacarídeo e triturando em tamanho de partícula médio adequado. Em mais uma forma de realização alternativa, as partículas de polissacarídeo são alongadas tais como partículas ovais ou semelhantes a fibra.

O sal adicionado na etapa (b) no presente método pode ser qualquer sal capaz de fornecer a rigidez desejada em temperatura e concentração de sal selecionadas, mas é preferivelmente composto de dois íons que igualmente são taxados na extremidade mais elevada da série Hofmeister.

Em uma forma de realização, o ânion do sal adicionado na

etapa (b) é um sulfato ou fosfato, preferivelmente sulfato. Em uma outra forma de realização, o cátion do sal é selecionado do grupo consistindo de Mg; Li; Na; K; e NH_4 . Em uma forma de realização vantajosa, o cátion do sal é selecionado do grupo consistindo de Mg e Na. Desta maneira, o sal adicionado na etapa (b) pode, por exemplo, ser MgSO_4 ou Na_2SO_4 . Em uma forma de realização vantajosa, o sal é MgSO_4 .

O(s) sal(is) na etapa (b) pode(m) ser adicionado(s) em solução aquosa ou forma sólida. Em uma forma de realização, a quantidade de sal(is) adicionado(s) na etapa (b) é suficiente para fornecer uma concentração final na suspensão que está na faixa de 0,5 a 1,3 M. Em uma forma de realização específica, a concentração de sal na suspensão está abaixo de 1,0 M, tal como na faixa de 0,5 a 1,0 M, e preferivelmente de 0,5 a 0,8 ou de 0,8 a 1,0 M. Em uma forma de realização alternativa, a concentração de sal na suspensão está acima de 1,0 M, tal como na faixa de 1,0 a 1,3 M, e preferivelmente de 1,0 a 1,2, por exemplo, cerca de 1,1 M ou de 1,2 a 1,3 M.

A suspensão a qual o sal foi adicionado é mantida em uma temperatura aumentada durante um tempo suficiente para as propriedades de polissacarídeo mudarem em direção às propriedades de fluxo melhoradas e rigidez melhorada observadas pelos presentes inventores, preferivelmente com agitação. A duração do tratamento de sal é facilmente determinada pela pessoa versada neste campo, e pode, por exemplo, durar por até uma hora, tal como de 20 a 40 minutos, e vantajosamente durante cerca de 30 minutos. Assim, a temperatura durante o tratamento de sal pode ser mantida qualquer uma na faixa de 94 a 98 °C, e é adaptada dependendo das propriedades desejadas da matriz. Em uma forma de realização, a temperatura está na faixa de 94 a 96 °C, tal como de 94 a 95 °C ou de 95 a 96 °C, tal como cerca de 94, cerca de 95 ou cerca de 96 °C. Em outra forma de realização, a temperatura está na faixa de 96 a 98 °C, tal como de 96 a 97 °C ou de 97 a 98 °C, tal como cerca de 97 ou cerca de 98 °C.

Em uma forma de realização vantajosa, o presente método compreende tratamento de sal, preferivelmente mediante a adição de sulfato, tal como Na_2SO_4 ou MgSO_4 , em uma temperatura de cerca de 96 °C. Em uma forma de realização mais vantajosa, o método compreende o tratamento de sal mediante a adição de Na_2SO_4 ou MgSO_4 até uma concentração de sal na suspensão acima de 1,0 M, o tratamento ocorrendo em uma temperatura de cerca de 96 a 97 °C.

Como se torna óbvio do acima, as partículas de polissacarídeo são reticuladas em uma etapa subsequente à adição de sal. Em uma forma de realização vantajosa, na etapa (c), a etapa de reticulação compreende a adição de um agente de reticulação. O agente de reticulação pode ser qualquer monômero adequado ou reagente bifuncional conhecido de polimerizar os polissacarídeos, tais como epicloroidrina, divinilsulfona, diepóxidos, diisocianatos etc. A reticulação de polissacarídeos é bem conhecida neste campo, ver, por exemplo, as US 4.973.683 e US 6.602.990 acima debatidas. Uma vantagem do presente método é que ele permite a fabricação de partículas de polissacarídeo altamente rígidas mediante a reticulação em uma temperatura mais elevada do que as técnicas comumente usadas, que por sua vez reduz ou mesmo elimina a formação de agregado. Sem desejar ser limitado por qualquer teoria específica, pode ser adotado que este aspecto está conectado com a adição de sal antes da reticulação.

Em uma forma de realização, o presente método compreende uma etapa subsequente de ligação de ligandos de cromatografia aos grupos de hidroxila da matriz de polissacarídeo reticulada. A ligação de ligandos de cromatografia, também conhecida como funcionalização ou às vezes derivação, a uma matriz insolúvel pode ser fornecida pela ligação de grupos carregados ou carregáveis para se preparar uma matriz de troca de íon; pela ligação de grupos de ligação que apresentam afinidade biológica para preparar uma matriz de afinidade; pela ligação de grupos de quelação para produzir

uma matriz de cromatografia de afinidade de metal imobilizada (IMAC); ou pela ligação de grupos hidrofóbicos para produzir uma matriz de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). Alternativamente, os grupos conhecidos como multimodais, isto é, grupos que contêm mais do que um grupo, tais como grupos de troca de íon além dos grupos hidrofóbicos, são ligados na matriz preparada de acordo com a invenção. Em uma forma de realização específica, os grupos funcionais são ligados de troca de íon selecionados do grupo consistindo de grupos de amônio quaternário (Q), dietilaminoetila (DEAE), dietilaminopropila, sulfopropila (SP) e carboximetila (CM). Os métodos para ligação de grupos funcionais a um suporte insolúvel tal como uma matriz de separação são bem conhecidos da pessoa versada neste campo e pode envolver uma etapa precedente de alilação do substituinte e uso de reagentes padrão e condições (Ver, por exemplo, Immobilized Affinity Ligand Technoques, Hermanson et al, Greg T. Hermanson, A. Krishna Mallia and Paul K. Smith, Academic Press, INC, 1992). Em uma forma de realização específica, a matriz de separação reticulada é fornecida com prolongadores, também conhecidas como ramos flexíveis, tentáculos ou felpa, antes da funcionalização. Um prolongador bem conhecido é dextrano; ver, por exemplo, a US 6.537.793 em que a adição de prolongadores a uma matriz de polissacarídeo é descrita com maiores detalhes.

A presente invenção também abrange a esterilização de uma matriz de separação reticulada tratada de acordo com a invenção. Em uma outra forma de realização, o método diz respeito ao recheio ou simplesmente fornecer um recipiente com uma matriz de separação e subsequente esterilizar o recipiente com seus conteúdos. Assim, uma forma de realização específica do método compreende fornecer a matriz de separação reticulada em uma coluna de cromatografia antes da esterilização. A esterilização pode ser realizada mediante o tratamento térmico e/ou vapor, tal como a

autoclavação; radiação; microondas; pressão elevada; reagentes químicos; ou qualquer outro método de esterilização bem conhecido.

Um outro aspecto da presente invenção é uma matriz de separação reticulada preparada como descrito acima. Em uma forma de realização vantajosa, a matriz de separação de polissacarídeo de acordo com a invenção é compreendida de partículas porosas essencialmente esféricas. Em uma forma de realização, as partículas apresentam um valor de K_{av} para um dextrano de 110 kDa de pelo menos cerca de 0,4, preferivelmente $>0,5$. Em uma forma de realização vantajosa, as partículas foram fornecidas com ligandos de cromatografia. Nesta forma de realização, os poros são de um tamanho suficiente para permitir a entrada de moléculas alvos para serem separadas, em conseqüência melhorar a capacidade de ligação das partículas. Além disso, o método de preparação descrito acima fornece uma matriz suficientemente rígida para o processamento em grande escala. Esta forma de realização é útil para qualquer uma das moléculas alvos exemplificadas abaixo no contexto do aspecto de uso, mas é particularmente vantajosa para moléculas alvos relativamente pequenas tais como proteínas.

Mesmo embora uma matriz de separação na forma de partículas tenha sido debatida acima, como compreendido pela pessoa versada neste campo, o presente método é igualmente útil para produção de matrizes de separação de outros formatos. Assim, a matriz de separação de acordo com a presente invenção pode ser preparada em qualquer forma comumente usada, tal como monolitos; filtros ou membranas; lascas; superfícies; capilares; fibras etc.

Em uma forma de realização vantajosa, o presente método de preparação de uma matriz de separação compreende o método de preparação de uma matriz de separação, cujo método compreende as etapas de

- (i) fornecer uma solução aquosa de um polissacarídeo nativo gelificável;

- (ii) diminuir a temperatura da solução de polissacarídeo para um valor abaixo de seu ponto de gelação;
- (iii) tratamento de sal mediante a adição de pelo menos um sal ao polissacarídeo resultante de (ii); e
- 5 (iv) reticular o polissacarídeo tratado com sal.

Em uma forma de realização, o polissacarídeo é um polissacarídeo nativo, isto é, um polissacarídeo cujos polímeros não foram submetidos a qualquer modificação ou substituição tal como derivação ou reticulação. Em uma forma de realização vantajosa, o(s) sal(is) é/são
10 adicionado(s) até uma concentração na solução na faixa de 0,5 M a 1,3 M.

Qualquer um dos detalhes acima no contexto do primeiro aspecto tal como o polissacarídeo, natureza do sal, temperatura e concentrações de sal etc. pode ser aplicável ao método acima para a preparação de outros formatos da matriz de separação.

15 Como se torna óbvio do acima, o polissacarídeo pode ser preparado em partículas. Em uma forma de realização, a matriz de separação é uma membrana, ou um filtro. À parte dos detalhes acima que resulta na matriz rígida da invenção, a preparação das membranas é bem conhecida e facilmente realizada pela pessoa versada neste campo.

20 Em uma forma de realização alternativa, a matriz de separação é um monolito. Nesta forma de realização, um *porogen* é vantajosamente adicionado para garantir a porosidade desejada do produto monolítico. Os *porogens* adequados são bem conhecidos neste campo, e podem, por exemplo, ser polietileno glicol. Outros detalhes com respeito à fabricação de
25 monolitos são bem conhecidos neste campo.

Um outro aspecto da invenção é uma coluna de cromatografia que compreende uma matriz de separação como descrito acima. A coluna pode ser produzida de qualquer material convencional, tal como um plástico biocompatível, por exemplo, polipropileno, vidro ou aço inoxidável. A coluna

pode ser de um tamanho adequado para purificação em escala de laboratório ou em grande escala. Em uma forma de realização específica, a coluna de acordo com a invenção é fornecida com adaptadores *luer*, conectores de tubulação e porcas que têm forma de cúpula.

5 Em uma forma de realização vantajosa, a etapa (i) acima compreende também fornecer um portador de membrana porosa e colocar em contato dito portador com a solução de polissacarídeo. O contato pode, por exemplo, ser por imersão do portador de membrana em uma solução quente de polissacarídeo, em cujo caso a membrana encharcada de polissacarídeo é
10 preferivelmente removida da solução antes o esfriamento da etapa (ii). O portador de membrana pode ser feito de qualquer material que seja compatível com a solução de polissacarídeo, e é consequentemente de forma vantajosa essencialmente hidrófila. Desta maneira, em uma forma de realização, o portador de membrana é produzido de um polímero hidrófilo, tal
15 como um polímero selecionado do grupo consistindo de agarose, ágar, celulose, dextrano, amido, quitosana, konjac, curdlan, carragenano, pectina, gellan, alginato e qualquer mistura de dois ou mais de ditos polímeros. Em uma forma de realização vantajosa do presente método, o portador de membrana é produzido de celulose. Na forma de realização mais vantajosa, o
20 portador de membrana de celulose é colocado em contato com uma solução de agarose para fornecer uma membrana de celulose-agarose híbrida. Em uma forma de realização alternativa, o portador de membrana é produzido de um polímero sintético, ou um material cerâmico, que foi tratado para apresentar uma superfície substancialmente hidrófila, tal como pela modificação química
25 da superfície. Assim, em uma forma de realização, o portador de membrana apresenta uma superfície hidrófila.

O portador de membrana usado no presente método pode ser uma membrana comercialmente disponível. Alternativamente, é preparado seguindo os métodos bem conhecidos no campo. O tamanho de poro médio

do portador de membrana dependerá de seu uso pretendido, e pode ser qualquer um na faixa de 0,1 a 10 μm , tal como de 0,2 a 5 μm . Em uma forma de realização específica, a membrana é fornecida como um cartucho. Em outra forma de realização, a membrana é uma membrana empilhada. Em uma forma de realização específica, a membrana de acordo com a invenção é fornecida em um rolo. Como compreendido pela pessoa versada, o tamanho e geometria do portador de membrana também dependerá do uso.

O tratamento de sal da etapa (iii) é vantajosamente realizado mediante a saturação do portador de membrana em uma solução de sal aquosa aquecida durante um período de tempo adequado para obter as propriedades de fluxo desejadas do produto final. Em uma forma de realização, a duração do tratamento de sal é de 0,5 a 4 h, tal como de 1 a 3 h, por exemplo, 1 ou 2 horas. A pessoa versada neste campo pode usar o teste simples para encontrar o período de tempo mais adequado para uma dada combinação de portador - polissacarídeo da membrana. Como mostrado na parte Experimental abaixo, os presentes inventores têm inesperadamente mostrado que mediante o tratamento de um portador de membrana revestido com polissacarídeo com sal de acordo com a invenção, a porosidade do portador de membrana, que foi substancialmente reduzida após a etapa de revestimento, pode ser criada novamente.

O revestimento de polissacarídeo da membrana tratada com sal é depois reticulado de acordo com qualquer método bem conhecido neste campo. Em uma forma de realização, o método para a preparação de uma membrana compreende uma etapa subsequente de ligação de ligandos de cromatografia aos grupos de hidroxila do revestimento de polissacarídeo. Tal funcionalização pela ligação de ligandos pode ser fornecida como descrito acima. Em uma forma de realização específica, a reticulação e funcionalização ocorrem substancialmente de forma simultânea.

Em outro aspecto, a presente invenção diz respeito a uma

membrana preparada por fornecer um portador de membrana poroso e contato de dito portador com uma solução aquosa de um polissacarídeo gelificável; em que um revestimento de polissacarídeo que apresente propriedades de fluxo melhoradas é obtido por um método como descrito na US 6.602.990 (Berg) ou SE 0402322-2 (Berg et al.). Igualmente ditos métodos envolvem uma modificação do polissacarídeo tal como por alilação ou outra derivação dos polímeros de polissacarídeo antes de sua gelação, que intensificará a rigidez do revestimento obtido após a reticulação. O portador de membrana pode, por exemplo, ser celulose ou qualquer outro material hidrófilo; e o polissacarídeo de revestimento é vantajosamente agarose.

Em uma forma de realização vantajosa, o presente método compreende uma etapa de esterilização da matriz de separação reticulada assim obtida. A esterilização pode ser realizada como debatido acima. Em uma forma de realização específica, a membrana de acordo com a invenção é preparada para uso único, também conhecida como um produto descartável. O uso único é vantajoso, por exemplo, em casos onde a membrana é utilizada para adsorver contaminantes, tais como contaminantes que por razões de segurança ou saúde são tratados com restrições. O uso único é também vantajoso em casos onde a pureza é de extrema importância, tal como na indústria farmacêutica. Uma outra vantagem de produtos de uso único é que a necessidade para validação de limpeza é eliminada.

Em uma forma de realização alternativa, a matriz de separação é um monolito. Nesta forma de realização, um *porogen* é vantajosamente adicionado para garantir a porosidade desejada do produto. Os *porogens* adequados são bem conhecidos neste campo, e podem, por exemplo, ser polietileno glicol. Outros detalhes a respeito da fabricação de monolitos são bem conhecidos neste campo.

Finalmente, a presente invenção se refere ao uso de uma matriz de separação preparada como descrito acima para virtualmente

qualquer espécie de moléculas alvos. Assim, em uma forma de realização do presente uso, uma biomolécula ou uma molécula orgânica é isolada, purificada e/ou removida de um líquido. Desta maneira, este aspecto é um método de cromatografia líquida, como debatido acima, e envolve a adsorção de uma molécula alvo na matriz e opcionalmente uma etapa subsequente de dessorção seletiva do alvo, comumente conhecida como eluição gradiente. Se requerido, uma ou mais etapas de lavagem são fornecida entre a adsorção e eluição. Alternativamente, o presente uso é para o retardo de uma molécula alvo, em cujo caso o alvo é seletivamente retardado na coluna, quando comparado com outros componentes. Neste caso, não existe nenhuma necessidade de uma etapa de eluição.

Em uma forma de realização, a presente coluna compreende de partículas porosas essencialmente esféricas. A coluna de cromatografia pode ser recheada com a matriz de separação de acordo com a invenção para uso em HPLC. Alternativamente, a matriz de separação de acordo com a invenção é meramente enchida na coluna para permitir o uso em modo de leito fluidificado, também conhecido como adsorção de leito expandido (EBA). Em mais uma outra alternativa, a separação de acordo com a invenção é um monolito que é polimerizado na coluna. Em uma forma de realização vantajosa da invenção, a coluna compreendendo uma matriz de separação de acordo com a invenção foi esterilizada para permitir o uso único. Uma tal coluna de uso único ou descartável é especialmente vantajosa na indústria farmacêutica, e às vezes também no campo de diagnóstico, quando a esterilidade é um problema.

A presente invenção também abrange um kit que compreende, em compartimentos separados, uma coluna de cromatografia compreendendo uma matriz de separação como descrito acima; pelo menos um tampão; e instruções escritas relacionadas com a purificação de moléculas alvos.

Finalmente, a presente invenção diz respeito ao uso de uma

matriz de separação preparada como descrito acima para qualquer espécie de molécula alvo. Assim, em uma forma de realização do presente uso, uma biomolécula ou uma molécula orgânica é isolada, purificada e/ou removida de um líquido. Assim, este aspecto é um método de cromatografia líquida, como
5 debatido acima, e envolve a adsorção de uma molécula alvo na matriz e opcionalmente uma etapa subsequente de dessorção seletiva do alvo, comumente conhecida como eluição gradiente. Se requerido, uma ou mais etapas de lavagem são fornecidas entre a adsorção e eluição. Alternativamente, o presente uso é para o retardo de uma molécula alvo, em
10 cujo caso o alvo é seletivamente retardado na coluna, quando comparado com outros componentes. Neste caso, não existe nenhuma necessidade de uma etapa de eluição.

Em uma forma de realização do presente uso, um fluxo líquido de pelo menos cerca de 300 cm/h, tal como pelo menos 400, preferivelmente
15 pelo menos 500 e mais preferivelmente pelo menos 700 cm/h, é aplicado a uma matriz compreendida de partículas essencialmente esféricas que apresentam uma K_{av} de pelo menos cerca de 0,4 para dextrano de peso molecular 110 kD.

Como se torna óbvio do acima, as moléculas alvos podem ser
20 quaisquer moléculas biológicas, tais como peptídeos, proteínas, tais como receptores e anticorpos monoclonais ou policlonais, ácidos nucleicos, tais como DNA, RNA e oligonucleotídeos, por exemplo, plasmídeos, vírus e células procarióticas ou eucarióticas; ou moléculas orgânicas, tais como candidatos de medicamento etc. Em uma forma de realização, o candidato de
25 medicamento pode ser usado na medicina personalizada. A matriz de separação preparada de acordo com a presente invenção é também útil para separar as moléculas alvos úteis na indústria de alimento e bebida, tal como a purificação de gêneros alimentícios funcionais e/ou a purificação de uma bebida da contaminação de moléculas alvos. As moléculas alvos bem

conhecidas da indústria de alimentos são produtos de soro de leite, tais como várias proteínas de leite.

Um último aspecto da presente invenção é o uso da matriz de separação preparada de acordo com a presente invenção como um portador para o crescimento de células aderentes em cultura. Tais células podem, por exemplo, ser células troncos embriônicas ou adultas. Um outro uso da matriz é para a imobilização de enzimas para produzir um biocatalisador.

PARTE EXPERIMENTAL

Os presentes exemplos são fornecidos para propósitos ilustrativos apenas, e não devem ser interpretados como limitativos da presente invenção como definido pelas reivindicações anexas. Todas as referências dadas abaixo e em outras partes no presente relatório descritivo são por meio desta aqui incluídas por referência.

Materiais e Métodos

Propriedades da partícula

Dextranos para a avaliação Kd de protótipos

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

Todos os dextranos diluídos com solução de NaCl 0,2 M, com a exceção de dextrano puro que foi diluído em NaCl 0,25 M.

Teste de efetividade

O teste de efetividade foi executado usando um ÄKTA™explorer (ID 494) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) mediante a injeção de solução de acetona a 1 %. Este teste fornece um valor da qualidade

do recheio da coluna. A assimetria aprovada está na faixa de 0,75 a 1,25 e um número de placa >1000 Nm.

Seletividade

5 A avaliação K_d foi realizada usando um ÄKTA™explorer (ID 494) equipado com um classificador automático A-900. Um Shimadzu RI-detector (RID-10A) foi conectado ao sistema ÄKTA™ para detecção das amostras de dextrano. As seguintes condições foram usadas:

Fluxo: 0,2 ml/min

Fase Móvel: 0,2 M NaCl

10 Circuito de injeção: 100 µl

Avaliação

Os picos de dextrano foram avaliados de acordo com os métodos bem conhecidos neste campo. Os valores K_d foram depois calculados como uma medida de superfície de poro disponível como se segue:

$$K_d = (V_e - V_0) / (V_c - V_0 - \text{matriz de gel}) = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

15 V_e = volume de retenção de dextrano eluído (ml)

V_0 = volume de vazio (retenção de dextrano puro) (ml)

V_c = volume de coluna calculado (altura do leito (cm) x área superficial da coluna (cm²)) (ml)

V_t – volume líquido total (volume de retenção de NaCl) (ml)

20 Exemplo 1: Síntese geral de partículas de polissacarídeo

Tratamento de sal: Aproximadamente 1,5 g de Sepharose™ HP não reticulada (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) foi lavado com 10 volumes de leito de água deionizada para fornecer uma suspensão aquosa de partículas de gel de 75 %. Os sais como especificados abaixo para cada protótipo foram depois adicionados na suspensão. A mistura de reação foi aquecida para a temperatura especificada abaixo para cada protótipo durante 30 minutos com agitação antes do esfriamento para baixo de 30 °C com banho de gelo. Os sais na suspensão foram depois removidos mediante a lavagem do

gel com 10 volumes de leito de água em um funil de vidro de sintetização.

Reticulação: A reticulação foi executada com epícloroidrina como o agente de reticulação e de acordo com Porath (Gel product for separation, 1982, EP 81850244) com 4 vezes a epícloroidrina mencionada e NaOH.

Funcionalização: Para fornecer um trocador de ânion, grupos de amônio quaternário (grupos Q) foram ligados às partículas reticuladas de acordo com os métodos bem conhecidos. Titulação de Cl^- com 0,1 M AgNO_3 foi executada após a ligação para medir a quantidade de grupos Q funcionais.

Recheio da coluna: As partículas preparadas como descrito acima foram recheadas em colunas HR 5/20 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) com água deionizada como o líquido de recheio. As colunas foram primeiro recheadas em uma vazão de 306 cm/h durante aproximadamente 15 minutos e depois em uma vazão de 764 cm/h durante aproximadamente 15 minutos. O recheio da coluna foi testado pela medição da assimetria máxima após a injeção de 25 μl de acetona a 0,4 % em uma vazão de 76 cm/h. As colunas com assimetria máxima entre 0,8 e 1,8 foram consideradas aceitáveis neste estudo.

Exemplos de 2 a 4: Protótipos de partícula

Partindo das matrizes de Sepharose comercialmente disponíveis, os protótipos foram preparados como descrito acima com sais, tempos de tratamento e durações variáveis. Os resultados são relatados nas Tabelas abaixo.

Exemplos de 5 a 6: Exemplos de partícula comparativos

Dois exemplos comparativos foram executados, testando as duas matrizes de SepharoseTM usadas como materiais de partida nos Exemplos de 2 a 4 acima, mas omitindo a etapa de tratamento de sal.

Resultados

Tabela 1: Vazões

Protótipo	Matriz de base	Tratamento de sal (mol/litro de suspensão de partícula)	Temp. máxima (0C)	Diâmetro de partícula (Malvern, d50 _v) (µm)	Vazão (max) (ml/min)
Ex. 2 U1262069	Sepharose™ 4B	0,35M MgSO ₄ + 0,5M Na ₂ SO ₄	96,8	58	34,5
Ex. 3 U1262073	Sepharose™ 6B	1,3M Na ₂ SO ₄	96,7	76	32,5
Ex. 4 U1262074	Sepharose™ 6B	0,5M MgSO ₄ + 0,5M Na ₂ SO ₄	96,9	55	85
U1262066 Ex Comp 5	Sepharose™ 4B	-	-	83	6
U1262067 Comp. Ex. 6	Sepharose™ 6B	-	-	89	10

Tabela 2: Teste da eficácia

Protótipo	Assimetria	Número de placa (Nm)
Ex. 2, U1262069	1,00	1609
Ex. 3, U1262073	0,77	2520
Ex. 4, U1262074	1,26	1489
Ex. Comp. 5, U1262066	0,75	2281
Ex. Comp. 6, U1262067	0,49**	886**

* Assimetria aceitável para o presente propósito

** Mesmo após repetir este recheio 4 vezes, ainda não cumpriu os critérios estabelecidos no presente teste.

Tabela 3: Superfície de poro disponível

Protótipo	Matriz de base	Vazão (max) (ml/min)	Diâmetro de partícula (Malvern, d50 _v) 110000)
Ex. 2, U1262069	Sepharose™ 4B	34,5	0,67
Ex. 3, U1262073	Sepharose™ 6B	32,5	0,59
Ex. 4, U1262074	Sepharose™ 6B	85	0,10
Ex. Comp. 5, U1262066	Sepharose™ 4B	6	0,65
Ex. Comp. 6, U1262067	Sepharose™ 6B	10	0,46

Exemplos de 7 a 10: Tratamento de sal das Membranas

5

Exemplo 7: Impregnação da membrana com solução de agarose – Membrana A

Uma solução de agarose a 1 % foi preparada por dissolver 0,3

g de agarose em 30 ml de água a 95 °C durante 3 h. Uma membrana de celulose regenerada (Sartorius, 0,45 µm, produto no. 3S18406-047N) foi depois imersa na solução de agarose durante 1 h a 95 °C. A membrana foi depois removida da solução de agarose e deixada esfriar para a temperatura ambiente de modo que a agarose pode formar gel dentro da estrutura de membrana.

Exemplo 8: Tratamento da membrana em solução de sal –

Membrana B

A membrana A híbrida preparada como descrito no Exemplo 7 foi imersa em sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄ (solução 1 M) (50 ml) em 96 °C durante 1 h e depois removida da solução e deixada esfriar. A membrana foi lavada extensivamente com água.

Exemplo 9: Medição da capacidade de fluxo da membrana

Um pedaço da membrana preparada e tratada como descrito acima foi colocado em um funil de filtro de 15 mm de diâmetro e 0,7 bar de vácuo foi aplicado. 50 ml de água foram despejados no funil e um cronômetro foi iniciado. O tempo até que toda a água tenha passado na membrana foi registrado. Análise em triplicata foi executada.

O fluxo em ml por centímetro quadrado e min foi calculado.

Exemplo 10: Resultados sobre a capacidade de fluxo da

membrana

Membrana	Solução de agarose (%)	Tratamento de sal	Fluxo (ml/min/cm ²)
Referência	-	-	21,8
Membrana A	1	não	2,1
Membrana B	1	sim	18,7

REIVINDICAÇÕES

1. Método de preparação de uma matriz de separação insolúvel, caracterizado pelo fato de que o método compreende tratamento de sal de um gel de polissacarídeo seguido pela reticulação dos polímeros de polissacarídeo.

2. Método de preparação de uma matriz de separação, caracterizado pelo fato de que o método compreende

(a) fornecimento de uma suspensão aquosa de partículas compreendidas de polissacarídeo nativo em forma de gel;

(b) tratamento de sal das partículas colocadas em suspensão mediante a adição de pelo menos um sal; e

(c) reticulação das partículas tratadas com sal.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o polissacarídeo é agarose.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o(s) sal(is) é/são adicionado(s) até uma concentração de sal na suspensão na faixa de 0,5 a 1,3 M.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o ânion do sal adicionado na etapa (b) é um sulfato.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o cátion do sal é selecionado do grupos que consiste de Mg; Na; K; Li e Cu.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o cátion do sal é selecionado do grupo que consiste de Mg e Na.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o sal é MgSO_4 .

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a temperatura durante o

tratamento de sal está na faixa de 94 a 98 °C.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a temperatura durante o tratamento de sal é de cerca de 96 °C.

5 11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que as partículas de polissacarídeo da etapa (a) foram preparadas mediante a emulsificação em um solvente orgânico.

10 12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que as partículas são lavadas após a emulsificação.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que na etapa (c), a etapa de reticulação compreende a adição de um agente de reticulação.

15 14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa subsequente de ligação de ligandos de cromatografia aos grupos de hidroxila do polissacarídeo em forma de gel.

20 15. Matriz de separação de polissacarídeo reticulado, caracterizada pelo fato de ser produzida como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes.

16. Matriz de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o volume de poro disponível corresponde a um valor K_{av} para um dextrano de 110 kD de pelo menos 0,5.

25 17. Coluna de cromatografia, caracterizada pelo fato de que compreende uma matriz de separação como definido em qualquer uma das reivindicações de 15 a 16.

18. Método de preparação de uma matriz de separação, caracterizado pelo fato de que o método compreende

- (i) fornecer uma solução aquosa de um polissacarídeo nativo gelificável;
- (ii) diminuir a temperatura da solução de polissacarídeo para um valor abaixo de seu ponto de gelação;
- 5 (iii) tratamento de sal mediante a adição de pelo menos um sal ao polissacarídeo resultante de (ii); e
- (iv) reticular o polissacarídeo tratado com sal.

10 19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o(s) sal(is) é/são adicionado(s) até uma concentração de sal na faixa de 0,5 a 1,3 M.

20. Matriz de separação de polissacarídeo reticulado, caracterizada pelo fato de ser produzida de como definida em qualquer uma das reivindicações de 18 a 19.

15 21. Matriz de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que é uma membrana ou um monolito.

22. Método de preparação de uma matriz de separação, caracterizado pelo fato de que o método compreende

- 20 (i) fornecer um portador de membrana porosa e colocar em contato dito portador com uma solução aquosa de um polissacarídeo gelificável;
- (ii) diminuir a temperatura da solução de polissacarídeo para um valor abaixo de seu ponto de gelação;
- (iii) tratamento de sal mediante a adição de pelo menos um sal; e
- (iv) reticular o polissacarídeo tratado com sal.

25 23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o portador de membrana apresenta uma superfície hidrófila.

24. Método de acordo com a reivindicação 22 ou 23, caracterizado pelo fato de que o portador de membrana é produzido de celulose.

25. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 22 a 24, caracterizado pelo fato de que o polissacarídeo é um polissacarídeo nativo.

5 26. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 22 a 25, caracterizado pelo fato de que o(s) sal(is) é(são) adicionados em uma concentração de sal na solução na faixa de 0,5 a 1,3 M.

27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 22 a 26, caracterizado pelo fato de que a temperatura durante o tratamento de sal está na faixa de 94 a 98 °C.

10 28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 22 a 27, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa subsequente de ligação de ligandos de cromatografia aos grupos de hidroxila do revestimento de polissacarídeo gelificados.

15 29. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 22 a 28, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa de esterilização da matriz de separação reticulada assim obtida.

20 30. Uso de uma matriz de separação como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de ser para purificar, isolar e/ou remover uma biomolécula ou uma molécula orgânica de um líquido.

31. Uso de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o fluxo da fase móvel aplicado na matriz de separação é pelo menos cerca de 300 cm/h.

RESUMO

“MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UMA MATRIZ DE SEPARAÇÃO,
MATRIZ DE SEPARAÇÃO DE POLISSACARÍDEO RETICULADO,
COLUNA DE CROMATOGRAFIA, E, USO DE UMA MATRIZ DE
5 SEPARAÇÃO”

A presente invenção diz respeito a um método de preparação de uma matriz de separação insolúvel, cujo método compreende tratamento de sal de um gel de polissacarídeo seguido pela reticulação dos polímeros de polissacarídeo. Em uma forma de realização, o método compreende fornecer
10 uma solução aquosa de um polissacarídeo nativo gelificável; diminuir a temperatura da solução de polissacarídeo para um valor abaixo de seu ponto de gelação; tratamento de sal mediante a adição de pelo menos um sal ao polissacarídeo resultante; e reticular o polissacarídeo tratado com sal. O polissacarídeo pode ser preparado, por exemplo, em partículas, membranas ou
15 monolitos.