

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 551**

51 Int. Cl.:

**B01J 20/32** (2006.01)

**B01J 20/286** (2006.01)

**B01D 15/38** (2006.01)

**B01J 20/26** (2006.01)

**B01J 20/289** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2017** **PCT/EP2017/057482**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017** **WO17174422**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2017** **E 17714436 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 3439780**

54 Título: **Matriz de cromatografía**

30 Prioridad:

**06.04.2016 GB 201605870**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.11.2024**

73 Titular/es:

**CYTIVA BIOPROCESS R&D AB (100.0%)**

**Björkgatan 30**

**751 84 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:

**MALOISEL, JEAN-LUC;**

**SÖDERMAN, TOBIAS, E.;**

**LIND, OLA y**

**EKLIND, IDA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 986 551 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

Matriz de cromatografía

**Campo técnico de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de la cromatografía, y más específicamente a matrices de cromatografía con una región de núcleo denso y una región de envoltura porosa.

**Antecedentes de la invención**

10 En separaciones de cromatografía de líquidos la resolución aumenta con el tamaño de partícula decreciente del material de relleno poroso. Esto se debe a las distancias de difusión más cortas dentro de las partículas, lo que conduce a una mayor eficiencia de la columna, a menudo medida como el número de platos de la columna. Sin embargo, un inconveniente es que el tamaño de partícula más pequeño conduce a contrapresiones de columna más altas, lo que es un fuerte factor de coste, particularmente para la cromatografía preparativa en la que la miniaturización de las columnas no es una ruta posible.

15 Una forma de desacoplar la resolución del tamaño de partícula ha sido usar medios peliculares, en los que un núcleo no poroso está revestido por una capa fina de material de fase estacionaria porosa. Sin embargo, tales medios no se han usado en gran medida en separaciones preparativas de biomacromoléculas, debido a dificultades de fabricación de medios peliculares con propiedades iguales a las de los medios de separación de biomacromoléculas usados regularmente, en los que bajos grados de adsorción no específica de proteínas, etc., alta accesibilidad a biomacromoléculas y altas capacidades de unión son parámetros importantes.

20 De este modo, existe la necesidad en este campo de nuevos desarrollos que permitan separaciones de biomacromoléculas con resolución mejorada mientras mantengan ventajas de medios de separación de biomacromoléculas no peliculares tales como baja adsorción no específica, capacidades razonables y altas selectividades para biomacromoléculas diana importantes.

25 El documento US 2005/222279 se refiere a una matriz base modificada en superficie, que es útil en métodos de separación cromatográfica. La matriz base modificada en superficie está compuesta por una matriz base polimérica porosa sobre la que se ha unido covalentemente un polímero polihidroxifuncional hidrófilo hiperramificado, que cuando se derivatiza en un intercambiador iónico presenta una capacidad superior, especialmente capacidad de proteínas, en comparación con la técnica anterior.

30 El documento US 2013/225701 describe métodos para injertar extensores de polímero sobre un sustrato poroso para separación cromatográfica y unir ligandos al polímero injertado. Los métodos proporcionados abordan la necesidad de sustratos porosos que tengan capacidad de unión a proteínas mejorada, y den como resultado que el sustrato tenga capacidad de unión a proteínas y/o selectividad de unión mejoradas, sin taponar o llenar los poros difusivos del sustrato poroso.

35 El documento US 2015/133618 aborda la necesidad de matrices de separación de alta capacidad y alta selectividad y proporciona una matriz de separación con alta capacidad de unión para la proteína diana en combinación con alta selectividad, así como un método de separación que ofrece alto rendimiento y alta selectividad. La matriz de separación propuesta comprende un soporte sólido y cadenas de copolímero unidas a dicho soporte sólido, comprendiendo dichas cadenas de copolímero un monómero cargado que comprende un grupo sulfonato o fosfonato, y un segundo monómero no cargado.

40 El documento US 5135650 describe la preparación de perlas semirrígidas, no porosas, que son moderadamente compresibles, para uso como fase estacionaria para HPLC. Las perlas de agarosa compresibles se vuelven rígidas y no porosas por contracción de la perla con el uso de un disolvente orgánico para colapsar la estructura de poros, seguido de reticulación para fijar los poros en su estado colapsado. A continuación, los poros se rellenan con una sustancia polimerizable y se realiza la polimerización por injerto.

45 El documento US 8574437 proporciona medios de cromatografía que comprenden perlas de envoltura para aplicaciones de cromatofoco. Las perlas de envoltura tienen un núcleo interno poroso con ligandos tamponantes inmovilizados que generan un gradiente de pH, y una envoltura externa funcionalizada con ligandos de IEX fuertes (ligandos de unión) y un extensor de superficie opcional, en las que los ligandos tamponantes y los ligandos de unión se ajustan independientemente unos de otros.

**Sumario de la invención**

50 Un aspecto de la invención es proporcionar una matriz de separación de alta resolución para la purificación de biomacromoléculas tales como proteínas. Esto se consigue con una matriz de separación según la reivindicación 1.

Una ventaja es que se puede proporcionar una alta resolución sin tener que recurrir a partículas pequeñas, lo que causa problemas con altas contrapresiones y bajos caudales.

Otro aspecto de la invención es proporcionar un método para separar una biomolécula diana de una muestra transportando la muestra a través de una columna rellena con la matriz de separación como se ha descrito anteriormente, transportando opcionalmente un líquido de lavado a través de la columna y transportando un eluyente a través de la columna para recuperar la biomacromolécula diana en un eluato.

- 5 Otro aspecto de la invención es proporcionar un uso de la matriz de separación descrita anteriormente para mejorar la resolución entre una biomacromolécula diana y al menos un contaminante.

Otras realizaciones adecuadas de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes.

### Definiciones

- 10 Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente aquí, y se entiende que incluyen también fragmentos de anticuerpo, proteínas de fusión que comprenden anticuerpos o fragmentos de anticuerpo y conjugados que comprenden anticuerpos o fragmentos de anticuerpo.

- 15 La expresión "matriz de cromatografía de afinidad" aquí quiere decir una matriz de separación que tiene ligandos (descritos aquí como "ligandos de afinidad" o "ligandos que comprenden grupos de afinidad") capaces de unirse a una especie diana con una constante de disociación en equilibrio  $K_D$  menor de alrededor de  $10^{-5}$  M, tal como entre  $10^{-14}$  y  $10^{-6}$  M.  $K_D$  se define aquí como  $K_D = [L][T]/[LT]$ , en la que [L] es la concentración de ligando libre, [T] es la concentración de especies diana libres y [LT] es la concentración de complejo ligando-especie diana. La mayoría de tales ligandos/grupos son proteínas y pueden incluir, p. ej., proteínas bacterianas de unión a inmunoglobulina y sus variantes, anticuerpos, estreptavidina, lectinas, etc. La especie diana puede ser, p. ej., una proteína tal como una inmunoglobulina.

### 20 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra un dibujo esquemático de la matriz de la invención.

La Fig. 2 muestra un esquema para la fabricación de la matriz de la invención.

- 25 La Fig. 3 muestra los datos de cromatografía por exclusión de tamaño para dextranos de diferente peso molecular, expresados como  $K_{av}$ , para columnas rellenas con prototipos 2D y 2I y perlas de agarosa reticuladas con soporte base de 40 micrómetros.

La Fig. 4 muestra cromatogramas de mezclas de mAb-citocromo C en el prototipo 1C y la referencia SP Sepharose 6 FastFlow (SP FF).

La Fig. 5 muestra cromatogramas de mezclas de conalbúmina + IgG policlona + citocromo C + lisozima en el prototipo 1D y la referencia SP Sepharose 6 FastFlow (SP FF).

- 30 La Fig. 6 muestra los datos de resolución para los pares de proteínas conalbúmina + citocromo C y citocromo C + lisozima en los prototipos 1A-1D y la referencia SP Sepharose 6 FastFlow (SP FF).

La Fig. 7 muestra secciones transversales de perlas de microscopía confocal de a) SP Sepharose 6 FastFlow y b) prototipo 1E, después de incubación con un anticuerpo IgG monoclonal fluorescente.

La Fig. 8 muestra el perfil de intensidad transversal de la sección transversal de microscopía confocal de la Fig. 7b).

### 35 Descripción detallada de realizaciones

- En un aspecto, la presente invención describe una matriz de separación para la purificación de biomacromoléculas. La matriz de separación comprende una pluralidad de partículas **1** que tienen una región **2** central de núcleo y una región **3** de envoltura periférica, en la que la región de núcleo y la región de envoltura comprenden ambas un material de soporte poroso. La región central comprende un polímero de vinilamida injertado (P) que comprende residuos de al menos un monómero de vinilamida polimerizable, y mientras que la región de envoltura es accesible a una biomacromolécula diana, la región central es menos accesible a la biomacromolécula diana que la región de envoltura, como se define en la reivindicación adjunta 1. La velocidad de difusión para la biomacromolécula diana en la región central puede ser, p. ej., inferior al 10% de la velocidad de difusión para la biomacromolécula diana en la región de envoltura y, adecuadamente, la región central puede ser sustancialmente inaccesible a la biomacromolécula diana. La accesibilidad se puede medir mediante cromatografía por exclusión de tamaño inversa a, p. ej. 20-50 cm/h de velocidad de flujo, como se indica en Gel Filtration Principles and Methods 5th edition, Pharmacia LKB 1991 (ISBN 91-97-0490-2-6), pp 8-11 y en los Ejemplos. Alternativamente, puede usarse microscopía confocal para evaluar la accesibilidad. En este caso, se puede usar una biomacromolécula diana marcada con fluorescencia como sonda y la intensidad de fluorescencia de las diferentes regiones se puede medir en el microscopio confocal y tomar como medida de la accesibilidad. La intensidad de fluorescencia en la región central puede ser, p. ej., menor del 90%, tal como menor del 70%, menor del 50% o menor del 10% de la intensidad de fluorescencia en la región de envoltura. La biomacromolécula diana puede ser una proteína, p. ej., con un peso molecular de  $>5$ ,  $>20$  o más de 50 kDa, y en particular una inmunoglobulina tal como IgG, con un peso molecular de alrededor de 150 kDa. La región central puede

contener adecuadamente al menos 50 mg/ml del polímero injertado, tal como al menos 70 mg/ml o 50-300, tal como 50-200 o 70-150 mg/ml, para reducir significativamente la accesibilidad para biomacromoléculas comunes. La determinación de la cantidad de polímero puede realizarse durante la fabricación como se ilustra en los ejemplos o en el producto final. En este último caso, se pueden usar, p. ej., métodos espectroscópicos o análisis elemental. En

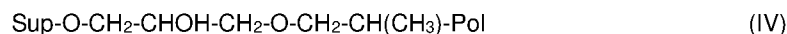
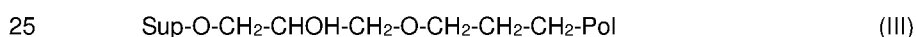
5 comparación con matrices peliculares que tienen un núcleo que se reviste subsecuentemente con un material poroso, la matriz de la invención tiene una estructura mejor controlada y es más fácil de fabricar, con variación controlada en el grosor de la envoltura y el contenido de polímero.

En ciertas realizaciones, la región de envoltura tiene un grosor  $d$  medio de 1-15 micrómetros. Alternativamente, o adicionalmente, el grosor medio puede ser del 0.5 al 6% del diámetro mediano ponderado en volumen o diámetro de esfera equivalente de las partículas. Las partículas pueden ser sustancialmente esféricas, pero también pueden desviarse de la forma esférica, p. ej., tener una esfericidad media de al menos 0.9, tal como al menos 0.95 o al menos 0.98 (una esfera tiene una esfericidad de 1). Las partículas pueden tener, p. ej., un diámetro mediano ponderado en volumen de 10-400 micrómetros, tal como 20-400, 30-100 micrómetros o 50-100 micrómetros.

Tanto la región de envoltura como la región de núcleo comprenden un material de soporte poroso. El material de soporte poroso puede comprender, p. ej., un polisacárido, que puede estar reticulado. Los ejemplos de polisacáridos adecuados incluyen agarosa y agar, que proporcionan estructuras de poro abierto con alta accesibilidad a proteínas y que son susceptibles de relleno de poros mediante injerto de polímeros vinílicos.

En algunas realizaciones, la región de núcleo tiene un corte de peso molecular para proteínas globulares de 1 a 500 kDa, tal como 60-500, 80-200 u 80-140 kDa.

20 El polímero (Pol) puede, p. ej., injertarse en el material de soporte (Sup), es decir, mediante polimerización de monómeros que conduce a la unión covalente de cadenas de polímero al material de soporte. Los enlaces o enlazadores entre las cadenas poliméricas y el material de soporte pueden ser, p. ej., de estructura I, II, III, IV o V.



Las estructuras I y II pueden formarse, p. ej., injertando vía grupos alilo introducidos mediante reacción de hidroxilos de soporte con un haluro de alilo y las estructuras III y IV pueden formarse injertando vía grupos alilo introducidos mediante reacción de hidroxilos de soporte con alil-glicidil-éter. La estructura V puede formarse, p. ej., injertando peróxidos o hidroperóxidos inmovilizados sobre el soporte. La unión del polímero mediante polimerización por injerto de monómeros tiene la ventaja de que se pueden lograr altas concentraciones de polímero injertado, ya que las moléculas de monómero pequeñas aún pueden difundirse en el núcleo mientras los poros se bloquean gradualmente por relleno con polímero injertado. La unión del polímero preparado es generalmente menos exitosa, ya que las moléculas grandes de polímero se excluirán al menos parcialmente del núcleo tan pronto como comience el llenado de poros.

El polímero (P) es un polímero de vinilamida y comprende residuos de monómero de vinilamida, tales como residuos seleccionados del grupo que consiste en N-vinilpirrolidona, N-vinilcaprolactama, N-vinilformamida y N-vinilacetamida. Puede comprender, p. ej., residuos de N-vinilpirrolidona, que son estables frente a la limpieza con NaOH 1 M y son hidrófilos.

40 La región de envoltura puede estar desprovista de funcionalidades de unión a biomacromoléculas (por ejemplo, proteínas), en cuyo caso las partículas pueden usarse para separaciones mediante cromatografía por exclusión de tamaño (también denominada filtración en gel). Sin embargo, en ciertas realizaciones, la región de envoltura comprende ligandos capaces de unirse a la biomacromolécula diana. Esto permite el uso de las partículas para una gama de técnicas cromatográficas. Para la cromatografía de intercambio iónico, los ligandos pueden comprender grupos cargados positivamente (intercambio aniónico) o negativamente (intercambio catiónico). Los ejemplos de grupos cargados positivamente incluyen grupos amonio cuaternario y aminas, mientras que los ejemplos de grupos cargados negativamente incluyen, p. ej., sulfonatos, sulfatos, carboxilatos y fosfonatos. Los ligandos pueden también, o alternativamente, comprender grupos hidrófobos tales como grupos alquil-alquilenos, arilo- o alquilarilo. Estos pueden ser útiles para la cromatografía de interacción hidrófoba. Las matrices con ligandos que comprenden grupos tanto cargados como hidrófobos pueden ser útiles para separaciones por cromatografía multimodal y los ejemplos de tales ligandos multimodales incluyen N-bencil-N-metiletanolamina, N-benzoilhomocisteína, 4-mercaptoetilpiridina, ácido p-aminobenzamidoacético, triptófano, fenilalanina, etc. Los ligandos pueden comprender además grupos de afinidad, de manera que la matriz se vuelve útil para cromatografía de afinidad. Los ejemplos de tales grupos de afinidad incluyen Proteína A y variantes de Proteína A, Proteína L, Proteína G, anticuerpos, lectinas, biotina, avidina, aptámeros, etc. La cantidad de ligandos en la región de envoltura puede variar dependiendo de la aplicación y el tipo de ligandos pero, como regla de oro, la región de envoltura puede comprender, por ejemplo, 10-20000 micromoles de

ligando/ml de región de envoltura, tal como 10-10000 micromoles/ml o 10-2000 micromoles/ml. El contenido de ligando de la región de envoltura puede determinarse por densitometría en microscopía confocal, usando un colorante fluorescente que se une a los ligandos y curvas de calibración de partículas con concentración de ligando conocida. También se puede determinar a partir de valoraciones de las partículas completas, que dan el contenido de ligando por volumen de matriz y que se dividen por la fracción de volumen de envoltura de la matriz.

Un método de fabricación de la matriz de separación descrita anteriormente comprende las etapas de:

a) proporcionar una pluralidad de partículas que comprenden un material de soporte poroso con sitios **101** de injerto. El material de soporte puede comprender sitios de injerto intrínsecos, p. ej., perlas de polidivinilbenceno con grupos vinilo residuales o perlas de polisacárido con grupos hidroxilo susceptibles de polimerización aniónica de epóxidos, etc., o con carbonos alfa susceptibles de injerto de radicales mediante, p. ej., iniciación de iones cerio. Alternativamente, los sitios de injerto pueden introducirse en el material de soporte poroso en una etapa a'), antes de la etapa a). Esto puede implicar, p. ej., derivatización de grupos hidroxilo en perlas de polisacárido con grupos alilo u otros grupos copolimerizables o puede implicar la inmovilización de funcionalidades iniciadoras de radicales, p. ej. peróxidos o hidroperóxidos. Se describen diferentes métodos para introducir sitios de injerto en el documento US20120029154 y en A Bhattacharya et al., Prog. Polym. Sci. 767-814 (2004).

Como se discutió anteriormente, el material de soporte poroso puede ser partículas/perlas de polisacárido reticuladas o no reticuladas, tales como agar o partículas/perlas de agarosa, pero también puede ser de otros tipos de materiales, tales como partículas/perlas de polímero sintético poroso (p. ej., hechas de divinilbenceno o polímeros de estireno/divinilbenceno o varios polímeros de acrilato, metacrilato o éter vinílico), partículas/perlas de sílice o vidrio, etc.

b) inactivar los sitios de injerto en una región **102** de envoltura.

La inactivación se puede realizar adecuadamente mediante la adición de una cantidad controlada (un déficit) de un reactivo que inactiva los sitios de injerto, y dado que el reactivo se añade desde el exterior de las partículas, el reactivo reaccionará principalmente con los sitios de injerto en una región de envoltura periférica. De manera adecuada, la velocidad de reacción entre el reactivo y los sitios de injerto es mayor que la velocidad de difusión del reactivo en las partículas, de modo que el reactivo se consume antes de que tenga lugar cualquier difusión apreciable en el núcleo. El grosor de la capa de envoltura inactivada puede controlarse entonces mediante la cantidad de reactivo añadido. Para el cálculo del grosor de la envoltura, se puede suponer que todos los sitios de injerto en la envoltura han sido consumidos por el reactivo de inactivación y que todos los sitios de injerto en el núcleo permanecen. La relación del contenido de sitios de injerto después de la inactivación ( $g_a$ ) y el contenido de sitios de injerto antes de la inactivación ( $g_b$ ) será entonces igual a la relación en volumen núcleo/(núcleo + envoltura). De este modo, el grosor  $d$  de la envoltura será  $d = R(1 - (g_a/g_b)^{1/3})$ , en la que  $R$  es el radio de la perla. La naturaleza del reactivo inactivador varía dependiendo de la estructura de los sitios de injerto. Para sitios de injerto insaturados (alilos, vinilos, etc.), un halógeno tal como bromo puede ser una elección adecuada. Los halógenos reaccionan rápidamente con dobles enlaces y los hacen no reactivos en polimerizaciones. La reacción con halógenos en disolución acuosa, p. ej., usando agua de bromo, también tiene la ventaja de que se forman halohidríns, que pueden usarse para derivatización de la región de envoltura con ligandos (p. ej., reactivos precursores de ligandos nucleófilos como aminas, tioles o iones sulfito). Sin embargo, los sitios de injerto insaturados también pueden inactivarse de otras maneras, p. ej., mediante reacciones de adición con tioles. Los hidroxilos como sitios de injerto pueden ser inactivados por reacción con grupos protectores de hidroxilo de los cuales se conoce un gran número en la técnica. Los hidroperóxidos o peróxidos, introducidos, p. ej., por los métodos del documento US20120029154 se pueden inactivar mediante tratamiento con agentes reductores tales como tioles o iones metálicos reductores, p. ej.,  $Fe^{2+}$ .

c) poner en contacto las partículas con una composición que comprende un monómero **103** de vinilamida polimerizable.

Las partículas pueden sumergirse en una disolución de uno o más monómeros polimerizables, que se deja difundir en las partículas y entrar en contacto íntimo con los sitios de injerto. El(Los) monómero(s) puede(n) tener adecuadamente un bajo peso molecular, p. ej., por debajo de 200 Da o por debajo de 100 Da, lo que asegura una fácil penetración en el núcleo, incluso cuando el núcleo comienza a bloquearse por cadenas de polímero injertadas en la etapa d). Los monómeros adecuados pueden ser monómeros de vinilo (incluyendo, por ejemplo, vinilamidas, ésteres de vinilo, éteres de vinilo, vinilarilos, acrilatos, acrilamidas, metacrilatos y metacrilamidas). El(Los) monómero(s) comprende(n) un monómero de vinilamida, tal como un monómero seleccionado del grupo que consiste en N-vinilpirrolidona, N-vinilcaprolactama, N-vinilformamida y N-vinilacetamida. Puede comprender, p. ej., N-vinilpirrolidona. Otros monómeros adecuados incluyen éteres vinílicos, p. ej., hidroxietil-vinil-éter, dietilenglicol-vinil-éter o metacrilatos, tales como metacrilato de hidroxietilo o monometacrilato de glicerol. Además, es posible usar una mezcla de monómeros, p. ej., que incluyen un monómero de reticulación (bifuncional o multifuncional). Una vinilamida tal como N-vinilpirrolidona puede combinarse, p. ej., con un metacrilato bi- o multi-funcional tal como dimetacrilato de glicerol. Además de monómeros vinílicos, también pueden emplearse otros monómeros polimerizables, p. ej., monómeros epoxídicos, tales como óxido de etileno o propileno u oxetanos.

d) iniciar la polimerización del monómero **104** polimerizable.

La polimerización se puede iniciar añadiendo un iniciador, o teniendo un iniciador como componente de la composición monomérica en la etapa c) y activando el inicio, p. ej., aumentando la temperatura para un iniciador térmico, añadiendo un coiniciador para un sistema iniciador doble, o irradiando un fotoiniciador con luz UV o visible. Esto es válido también para el caso en el que los puntos de injerto sean grupos iniciadores inmovilizados. Alternativamente, la polimerización puede iniciarse por irradiación con radiación ionizante, tal como radiación gamma o un haz de electrones. Después de la polimerización, cualquier monómero residual y otros reactivos, así como polímero no injertado, se pueden retirar por lavado de las partículas. Si se usa un monómero de reticulación, el nivel debe ser bajo para evitar una disolución de reacción reticulada, preferiblemente por debajo del 2% (calculado basado en la cantidad total de monómeros). El peso molecular y la morfología del polímero formado se pueden controlar variando la concentración de iniciador, la concentración de monómero, la concentración de reticulante, usando agentes de transferencia de cadena o diferentes disolventes de reacción.

El método también puede comprender una etapa e) de hacer reaccionar las partículas con un reactivo precursor de ligando para acoplar ligandos a la región de envoltura. La etapa e) se puede realizar después de la etapa d) o después de la etapa b) y antes de las etapas c) y d). Si la inactivación de los sitios de injerto en b) implica una reacción que produce simultáneamente grupos adecuados para la reacción con reactivos de precursor de ligando, la etapa e) puede llevarse a cabo ventajosamente después de la etapa b). Este puede ser el caso, p. ej., cuando los sitios de injerto insaturados se inactivan mediante halógeno acuoso, formando halohidrinatos que se hacen reaccionar fácilmente con reactivos de precursor de ligando nucleófilo tales como aminas e iones sulfito. Con ligandos grandes como, p. ej., ligandos de afinidad proteínica, puede ser ventajoso realizar la etapa e) después de la etapa d), ya que el polímero injertado evita que las moléculas de ligando grandes entren en el núcleo y no hay riesgo de perder ligando caro por acoplamiento en el núcleo. Con los ligandos acoplados sólo en la envoltura, todos están disponibles para la unión y contribuyen a la capacidad de unión.

En algunas realizaciones, el material de soporte poroso comprende grupos hidroxilo unidos a carbono y el método comprende:

en la etapa a') hacer reaccionar las partículas con un reactivo de alilación para obtener al menos 50 micromol/ml de grupos alilo unidos covalentemente a las partículas; y

en la etapa b) hacer reaccionar las partículas primero con un halógeno durante un período de hasta 30 minutos y después con una disolución acuosa alcalina.

En otro aspecto, la invención describe un método para separar una biomacromolécula diana, que comprende las etapas de:

a) proporcionar una muestra que comprende la biomacromolécula diana;

b) transportar la muestra a través de una columna rellena con la matriz de separación como se ha descrito anteriormente;

c) opcionalmente transportar un líquido de lavado a través de la columna; y

d) transportar un eluyente a través de la columna y recuperar la biomacromolécula diana en un eluato.

En algunas realizaciones, la velocidad de flujo a través de la columna en la etapa b) y/o d) es de al menos 70 cm/h, tal como al menos 150, al menos 200 o 70-500, tal como 70-300 o 150-300 cm/h.

En otro aspecto, la invención describe el uso de la matriz de separación descrita anteriormente para mejorar la resolución entre la biomacromolécula diana y al menos un contaminante. La resolución puede mejorarse, p. ej., en comparación con matrices homogéneas a velocidades de flujo superiores a 70 cm/h, superiores a 150 o superiores a 200 cm/h. La resolución se define aquí según la definición estándar, en la que la resolución  $R_s$  de dos picos en un cromatograma es:

$$R_s = 2 * [(t_R)_B - (t_R)_A] / [W_A + W_B]$$

en la que  $(t_R)_A$  es el tiempo de retención del pico A,  $(t_R)_B$  el tiempo de retención del pico B,  $W_A$  la anchura del pico A y  $W_B$  la anchura del pico B. Las anchuras se miden aquí en unidades de tiempo. Sin embargo, es igualmente posible introducir los volúmenes de retención de los picos A y B y en ese caso usar las anchuras de pico medidas en unidades de volumen. En la cromatografía de líquidos, la resolución usualmente disminuye a velocidades de flujo crecientes debido al ensanchamiento de pico, pero las matrices de la invención son menos susceptibles a tal pérdida.

**Ejemplos (todos realizados a 22 +/- 2°C a menos que se indique lo contrario)****Ejemplo 1 - Síntesis de prototipos de partícula de 96 micrómetros****Alilación**

5 300 g de perlas de agarosa reticulada escurridas de diámetro mediano (d50v) de 95.8 micrómetros, Kav para dextrano de Pm 50 kDa = 0.5, lavadas con agua destilada, se mezclaron con 300 ml de disolución acuosa de NaOH al 50% en un matraz de 2 litros. El matraz se equipó con un agitador superior y se sumergió en un baño de agua a 50°C. Después de 30 min con agitación, se añadieron 93.2 ml de alil-glicidil-éter (AGE) y se dejó que la reacción siguiera durante otras 18.5 h. El gel se lavó con agua destilada (un volumen de gel), etanol (un volumen de gel) y finalmente agua destilada (8 volúmenes de gel). El contenido de alilo (método siguiente) fue de 0.288 mmol/ml.

**10 Valoración de grupos alilo**

El gel se lavó con agua destilada y se extrajo una muestra de 1 ml de gel escurrido y se suspendió en 9 ml de agua en un matraz. Se añadió agua saturada de bromo hasta que persistía un color amarillo debido a un exceso de Br<sub>2</sub>. La muestra se evacuó con agitación para retirar el exceso de bromo. La mezcla se transfirió después a un recipiente de valoración y se llevó hasta 20 ml con agua destilada. Se añadieron 2-3 gotas de ácido nítrico concentrado antes de la valoración de los iones bromuro libres con AgNO<sub>3</sub>.

**15 Bromación de la región de envoltura**

Se transfirieron 600 g (ml) de las perlas de agarosa aliladas escurridas a un matraz de fondo redondo de 4 l junto con 3 l de agua destilada. Se aplicó agitación mecánica (250 rpm).

20 Se preparó una disolución de 3.375 ml de bromo en 400 ml de agua. La disolución de bromo (equivalente a los alilos en una envoltura de 7 µm de la perla de 95.8 µm) se añadió a través de un embudo de goteo durante aproximadamente 15 minutos a una velocidad de agitación de 300 rpm. Después de 20 minutos, el gel se lavó con 10 x 1 VG con agua destilada.

**Funcionalización de intercambiador catiónico de la región de envoltura**

25 Se transfirieron 619 g (ml) de gel bromado de envoltura a un matraz de fondo redondo de 2 l. Se añadieron 124 ml de agua destilada y 148.5 g de sulfito de sodio. Se aplicó agitación mecánica con hélice y la disolución se dejó durante 30 min a 250 rpm. El pH se ajustó a 12.5 añadiendo NaOH al 50% y el matraz se sumergió en un baño de agua a 50°C. La reacción progresó durante 21 h. El gel se lavó 10xVG con agua destilada. Se encontró que el contenido de grupos intercambiadores catiónicos de sulfonato era de 0.073 mmol/ml mediante valoración estándar con NaOH. El intercambiador catiónico se usó como intermedio para el injerto.

**Determinación del grosor de la envoltura**

30 6 g (ml) de gel bromado de envoltura se transfirieron a un tubo Falcon. Se añadieron 5.4 ml de agua destilada y 624 µl de NaOH acuoso al 50%. El tubo se colocó en una mesa de agitación a 50°C. La reacción progresó durante 18 h. El gel se lavó 10xVG con agua destilada. La cantidad de grupos alilo residuales se determinó entonces por valoración como se describe anteriormente y se encontró que era de 0.288 mmol/ml. Para el cálculo del grosor de la envoltura, se supuso que todos los alilos en la envoltura se habían consumido por bromación/hidrólisis alcalina y que todos los alilos en el núcleo permanecieron. La relación del contenido de alilo después de la bromación/tratamiento alcalino (a<sub>a</sub>) y el contenido de alilo antes de estos tratamientos (a<sub>b</sub>) será entonces igual a la relación de volumen núcleo/(núcleo + envoltura). De este modo, el grosor d de la envoltura será  $d = R(1 - (a_a/a_b)^{1/3})$ , en la que R es el radio de la perla (47.9 micrómetros). Con a<sub>a</sub> = 0.214 mmol/ml y a<sub>b</sub> = 0.288, d será entonces 4.5 micrómetros.

**Injerto de vinilpirrolidona en núcleo alílico**

40 25.4 g de suspensión de gel alilado (intermedio) se transfirió a un filtro de vidrio (por. 3). El gel se lavó con 7 x 2 VG de agua destilada seguido de 3 x 1.5 VG de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y se secó por aspiración. El gel seco se transfirió a un matraz de 100 ml y se añadió disolución de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M hasta un peso total de 36.6 g. Se añadieron 3.87 ml de vinilpirrolidona (VP), 36.3 µl de dimetacrilato de glicerol (GDMA) y 0.081 g de iniciador de dihidrocloruro de α,α-zodiisobutiramidina (ADBA). Se burbujeó nitrógeno gaseoso a través de la disolución de reacción con una pipeta pasteur durante 20 minutos. El matraz se sumergió en un baño de glicerol con la temperatura establecida a 45°C y la velocidad de agitación a 250 rpm. Después de 17 horas, se añadieron 32.5 g de agua destilada y la suspensión se dejó agitar durante 30 min a la temperatura de reacción. El gel se transfirió a un filtro de vidrio y se lavó con 10 VG de agua destilada. La reacción se dejó reposar en agua en el refrigerador durante 48 h y después se lavó con 5 x 1 VG de etanol y finalmente 10 x 1 VG de agua de nuevo.

50 Se realizaron experimentos de injerto adicionales en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M de la misma manera con las cantidades mostradas en la Tabla 1. Los experimentos en agua se realizaron de la misma manera excepto por el lavado inicial en el que el gel se lavó con 10 x VG de agua destilada y se añadió agua destilada hasta un peso total según la tabla anterior.

Tabla 1. Condiciones de injerto para diferentes prototipos

Experimento	H <sub>2</sub> O/Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 M	gel g	GDMA %	GDMA $\mu$ l	VP+GDMA %	VP ml	Iniciador %	ADBA g
1A	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 M	15	1	36.3	10	3.870	2	0.081
1B	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 M	15	1	36.3	10	3.870	5	0.203
1C	H <sub>2</sub> O	15	1	72.6	20	7.739	2	0.163
1D	H <sub>2</sub> O	15	1	72.6	20	7.739	5	0.407
1E	H <sub>2</sub> O	15	0	0	22.5	8.795	5	0.457
1F	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1M	15	0	0	11	4.300	20	0.894

Las mezclas de reacción tenían viscosidades diferentes y no eran igualmente fáciles de lavar después de la reacción. Los experimentos realizados en agua fueron más viscosos y más difíciles de lavar inicialmente en comparación con los realizados en sulfato de sodio. Los prototipos A y B tenían dos capas cuando se lavaron con agua, una capa ligera que flotaba en la superficie del agua y una capa pesada que se sedimentaba en el fondo.

Determinación del peso seco (contenido de sólidos)

El peso seco de 1 ml de matriz se registró en una balanza de evaporación (analizador de humedad) después de la reacción de injerto y los resultados se muestran en la Tabla 2. La cantidad de copolímero de vinilpirrolidona-dimetacrilato de glicerol (PVP-GDMA) injertado se calculó a partir de la diferencia en el peso seco entre los prototipos injertados y lavados y el material de soporte poroso antes del injerto.

Tabla 2. Peso seco para prototipos injertados.

Prototipo	Peso seco [mg/ml]	Soporte base en peso seco [mg/ml]	PVP-(GDMA) o PVP unido [mg/ml]
1A	184	107	77
1B	204	107	97
1C	188	107	81
1D	204	107	97
1E	204	107	97
1F	233	107	126

Acoplamiento de dextrano a núcleo alílico

Se mezclaron 40 g de producto intermedio escurrido con 45 ml de agua y se añadió metacrilato de glicidilo (GMA) con agitación. Se añadió el iniciador de radicales 2,2'-azobis-(2-aminopropano) HCl en una atmósfera de nitrógeno y se continuó el flujo de nitrógeno durante 15 min a temperatura ambiente, después de lo cual se elevó la temperatura hasta 55°C y se continuó la reacción durante 2.5 h a 55°C. Entonces se filtró el gel y se lavó con agua destilada, acetona y agua destilada. Después de almacenar el gel en un refrigerador durante un fin de semana, se mezclaron 30 g de gel escurrido con una disolución de 30 g de dextrano (Pm 5000 en 1G y 1H y Pm 3500 en 1I) en 60 ml de agua destilada. Se añadieron 7.91 ml de NaOH acuoso al 50% y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación a 50°C durante la noche. El gel se filtró después y se lavó con agua.

Tabla 3. Prototipos acoplados a dextrano

Prototipo	GMA (g)	Iniciador (mg)	Soporte base en peso seco (mg/ml)	Peso seco con GMA (mg/ml)	GMA unido (mg/ml)	Peso seco con dextrano (mg/ml)	Dextrano unido (mg/ml)
1G	2.5	48	114	142	20	151	8.7
1H	3.8	72	114	172	58	176	4.8
1I	5.1	96	114	194	80	206	12.9



Como se observa en la Tabla 3, las cantidades de dextrano unidas fueron muy bajas, lo que indica que las moléculas de dextrano no penetran eficientemente en el núcleo.

## Ejemplo 2 - Síntesis de prototipos de partículas de 40 micrómetros

### Alilación

- 5 300 g de bolas de agarosa reticulada escurridas de diámetro mediano (d50v) de 40 micrómetros, Kav para dextrano de Pm 124 kDa = 0.5, preparadas según los métodos descritos en la patente de EE. UU. 6602990 se lavaron con agua destilada y se mezclaron con 300 ml de disolución acuosa de NaOH al 50% en un matraz de 2 l. El matraz se equipó con un agitador superior y se sumergió en un baño de agua a 50°C. Después de 30 min con agitación, se añadieron 93.2 ml de alil-glicidil-éter (AGE) y se dejó que la reacción siguiera durante otras 18.5 h. El gel se lavó con agua destilada (un volumen de gel), etanol (un volumen de gel) y finalmente agua destilada (8 volúmenes de gel). El contenido de alilo (método siguiente) fue de 0.283 mmol/ml.

Bromación de la región de envoltura (que tiene como objetivo un grosor de envoltura de 5 micrómetros)

- 15 245 g de la suspensión de gel alilado (que contiene 140 ml de gel escurrido) se transfirieron a un filtro de vidrio y se lavaron tres veces con agua. Después de escurrir, el gel se transfirió a un matraz de 2 l y se añadió agua para dar un peso total de 800 g. Se añadieron 227.9 g de bromo acuoso (1.60% p/p) al matraz durante un periodo de 30-60 s con agitación vigorosa. La reacción se dejó seguir durante otros 15 minutos. El gel se lavó entonces con agua (5 volúmenes de gel).

### 2A. Inactivación de la región de envoltura

- 20 Se suspendieron 30 ml del gel bromado con 25 ml de agua y 5.07 ml de NaOH acuoso al 50% (1.6 M) en un matraz de 250 ml. Con agitación, el matraz se sumergió en un baño de agua a 50°C durante 18 h. El gel se lavó luego con agua (10 volúmenes de gel). El contenido de alilo restante se determinó en una muestra de este gel (para una envoltura de 5 micrómetros, el nivel de alilo teórico debería ser de 0.121 mmol/ml). El contenido de alilo fue de 0.182 mmol/ml, que corresponde a un grosor de envoltura de 3 micrómetros, calculado como se describe anteriormente.

### 2B. Funcionalización de intercambiador catiónico de la región de envoltura

- 25 Se suspendieron 54 ml del gel bromado con 16.5 g de sulfito de sodio en 55 ml de agua en un matraz de 250 ml. El pH se ajustó a 11.9 mediante la adición de NaOH acuoso al 50%. Con agitación, el matraz se sumergió en un baño de agua a 50°C durante 18 h. Después de la neutralización con ácido acético al 60%, el gel se lavó luego con agua (10 volúmenes de gel). Se encontró que el contenido de grupos intercambiadores catiónicos de sulfonato era de 0.065 mmol/ml mediante valoración estándar con NaOH.

- 30 2C. Funcionalización de intercambiador aniónico de la región de envoltura

- 35 Se suspendieron 54 ml de gel bromado con 20 ml de agua y 9.8 ml de cloruro de trimetilamonio (TMAC) en un matraz de 250 ml. El pH se ajustó a 11.5 mediante la adición de NaOH acuoso al 50%. Con agitación, el matraz se dejó a temperatura ambiente (22°C) durante 18 h. Después de la neutralización con ácido acético al 60%, el gel se lavó después con agua (10 volúmenes de gel). Se encontró que el contenido de grupos de intercambio aniónico de amonio cuaternario era de 0.101 mmol/ml mediante valoración estándar de capacidad iónica de cloruro.

### 2D. Inactivación de la región del núcleo (envoltura de intercambiador catiónico)

- 40 Se suspendieron 25 ml del gel de B con 25 ml de agua y 1.0 g de NaOAc\*3H<sub>2</sub>O en un matraz. Después de agitar, se añadió agua con bromo hasta que se obtuvo un color amarillo persistente. Después se añadió formiato de sodio para inactivar el exceso de bromo. El gel se lavó con 10 volúmenes de agua y después de escurrir se mezcló con 20.8 ml de agua y 4.225 ml de NaOH acuoso al 50% (1.6 M) en un matraz de 100 ml. Con agitación, el matraz se sumergió en un baño de agua a 50°C durante 19 h. El gel se lavó luego con agua (10 volúmenes de gel) y se almacenó en etanol acuoso al 20% que contiene acetato 0.2 M.

### 2E. Inactivación de región del núcleo (envoltura de intercambiador aniónico)

- 45 Se suspendieron 25 ml del gel de C con 25 ml de agua y 1.0 g de NaOAc\*3H<sub>2</sub>O en un matraz. Después de agitar, se añadió agua con bromo hasta que se obtuvo un color amarillo persistente. Fue necesario menos Br<sub>2</sub>(ac) cuando se bromó el núcleo alílico que para D. Después se añadió formiato de sodio para inactivar el exceso de bromo. El gel se lavó con 10 volúmenes de agua y después de escurrir se mezcló con 20.8 ml de agua y 4.225 ml de NaOH acuoso al 50% (1.6 M) en un matraz de 100 ml. Con agitación, el matraz se sumergió en un baño de agua a 50°C durante 19 h. El gel se lavó luego con agua (10 volúmenes de gel) y se almacenó en etanol acuoso al 20%.

- 50 2F. Injerto de vinilpirrolidona en núcleo alílico, envoltura inactivada

Se mezclaron 10 g de gel escurrido de A con 65 g de agua en un matraz de 250 ml. Se añadieron al matraz 0.5 g de iniciador de dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (AAPH) y 24.5 g de vinilpirrolidona (VP). Después de

burbujear con N<sub>2</sub> durante 4 minutos, el matraz se sumergió en un baño de agua a 55°C durante 18 h. La suspensión altamente viscosa se lavó luego en un filtro de vidrio con agua (5 volúmenes de gel), etanol (>10 volúmenes de gel) y 10 veces con agua (5 volúmenes de gel cada uno) y el gel se almacenó en etanol acuoso al 20%.

2G. Injerto de vinilpirrolidona en núcleo alílico, envoltura de intercambiador catiónico

- 5 Se siguió el mismo procedimiento que en F, pero usando el gel de B. El producto se almacenó en etanol acuoso al 20% que contiene acetato 0.2 M.

2H. Injerto de vinilpirrolidona en núcleo alílico, envoltura de intercambiador aniónico

El mismo procedimiento que en F, pero usando el gel de C. El producto se almacenó en etanol acuoso al 20%.

2I. Acoplamiento de alildextrano a núcleo alílico e injerto de vinilpirrolidona a alildextrano

- 10 15 ml de gel 2A, 15 ml de agua y 0.6 g de NaOAc\*3H<sub>2</sub>O se mezclaron en un matraz de 100 ml. Se añadió agua con bromo hasta que se obtuvo un color amarillo persistente. El exceso de bromo se inactivó añadiendo formiato de sodio. El gel se lavó entonces con cinco volúmenes de agua.

- 15 El gel bromado se añadió a una disolución de 15 g de alildextrano (Pm 70 000, contenido de alilo 1.4 mmol/g) en 15 ml de agua y la temperatura se elevó a 50°C. Se añadieron 5 ml adicionales. Después de 90 minutos, se añadieron 2.0 ml de NaOH acuoso al 50% y 80 mg de borohidruro de sodio y se dejó que la reacción progresara durante 16.5 h con agitación. El gel se lavó entonces 10 veces con agua.

- 20 Se mezclaron 13 g del gel escurrido con 84.5 g de agua y se añadieron 0.65 g de iniciador AAPH y 31.9 g de vinilpirrolidona. Después de 5 min de burbujeo de nitrógeno, la mezcla se calentó a 55°C y se dejó reaccionar durante 18.5 h. La mezcla viscosa se lavó entonces en un filtro de vidrio cinco veces con agua, cinco veces con etanol y 10 veces con agua.

2J. Acoplamiento de alildextrano a núcleo alílico e injerto de vinilpirrolidona a alildextrano, envoltura de intercambiador catiónico

El mismo procedimiento que en 2I, pero partiendo del gel 2B.

- 25 2K. Acoplamiento de alildextrano a núcleo de alilo e injerto de vinilpirrolidona a alildextrano, envoltura de intercambiador aniónico

El mismo procedimiento que en 2I, pero partiendo del gel 2C.

Tabla 4. Peso seco para prototipos de alildextrano

Prototipo	Peso seco de gel de núcleo alílico inicial (mg/ml)	Peso seco después del acoplamiento con alildextrano (mg/ml)	Alildextrano unido (mg/ml)	Peso seco después del injerto de PVP (mg/ml)	PVP unido (mg/ml)
2I	140	184	44	322	138
2J	158	184	26	300	142
2K	170	192	22	N/A	

### 30 Ejemplo 3 - Evaluación de las accesibilidades de proteínas de las regiones de núcleo y envoltura por microscopía confocal

Las accesibilidades se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia confocal usando sondas de proteína marcadas fluorescentemente, lo que permite una obtención de imágenes tridimensionales de alta resolución de cómo las sondas penetran en las diferentes regiones.

Sondas

- 35 Un anticuerpo monoclonal IgG, marcado con colorante fluorescente Alexa 488 (Molecular Probes)

Seroalbúmina bovina (BSA), marcada con colorante fluorescente Cy5 (GE Healthcare)

Citocromo C, marcado con colorante fluorescente Cy5 (GE Healthcare)

## Prototipos

1E (del Ejemplo 1). Perlas de agarosa de 96 micrómetros con ligandos de intercambio catiónico de sulfonato (contenido total de ligando 0.073 mmol/ml de matriz) en una región de envoltura y polivinilpirrolidona (PVP) injertada en la región de núcleo.

- 5 Referencia - SP Sepharose 6FF, (GE Healthcare), perlas de agarosa reticulada de 90 micrómetros con ligandos de intercambio catiónico de sulfonato (matriz de 0.194 mmol/ml) distribuidos homogéneamente por las perlas.

## Método

- 10 Las perlas se incubaron en las disoluciones de sonda (300 mg de proteína/ml de gel) durante 4 h en tubos Eppendorf. A continuación, se lavaron o se observaron directamente en el microscopio confocal (SP8, Leica) equipado con un objetivo de inmersión en agua de 63x1.20.

Las proteínas marcadas con Cy 5 (BSA y citocromo C) se escanearon en dirección xy y con series de secciones (100 secciones ópticas en dirección z (tamaño de paso ~3.5  $\mu$ m). Velocidad de escaneo 400; Tamaño de píxel: 512 x 512; media de fotogramas 2. Longitud de onda de excitación 633 nm. Luz fluorescente emitida detectada entre 650-800 nm.

- 15 Para Mab - Longitud de onda de excitación Alexa 488 nm. Luz fluorescente emitida detectada entre 490-555 nm. Otros ajustes son los mismos que anteriormente,

Para Mab-Alexa 488 y BSA-Cy5, las partículas se escanearon directamente después de la incubación sin ningún lavado. Como la disolución de citocromo C dio un fondo más alto, las partículas se lavaron con tampón mediante dilución repetida, centrifugación y decantación.

## Resultados

- 20 Como se muestra en la Fig. 7a), las perlas de referencia adsorbieron las proteínas homogéneamente por todas las perlas. Sin embargo, las perlas prototipo con ligandos sólo en la región de envoltura y un núcleo injertado con PVP sólo adsorbieron proteína en los 7-8 micrómetros más externos de las perlas, correspondientes a la región de envoltura (figuras 7b y 8). La proteína pequeña citocromo C (12 kDa) pudo penetrar en el núcleo injertado con PVP en cierta medida pero no permaneció allí después del lavado, lo que muestra que solo estaba unida en la región de la envoltura.
- 25 Los resultados también muestran que el grosor de la región de envoltura puede determinarse con precisión a partir de un perfil de intensidad obtenido en el microscopio confocal (Fig. 8).

## Ejemplo 4 - Evaluación de las accesibilidades de proteínas de las regiones de núcleo y envoltura mediante cromatografía por exclusión de tamaño

- 30 Los prototipos 2D y 2I, junto con partículas de base de agarosa de 40 micrómetros no modificadas, se evaluaron mediante cromatografía por exclusión de tamaño. Las perlas se introdujeron en columnas de cromatografía y se aplicaron a las columnas disoluciones de dextranos de diferentes pesos moleculares y se eluyeron. Los valores de  $K_{av}$  (la fracción del volumen de poros accesible para moléculas sonda de un peso molecular particular) para los diferentes dextranos se calcularon a partir de los tiempos de retención según métodos estándar, como se describe en Gel Filtration Principles and Methods 5th edition, Pharmacia LKB 1991 (ISBN 91-97-0490-2-6), pp 8-11. Las curvas de  $K_{av}$  frente a log Pm obtenidas se muestran en la Fig. 3 y la Tabla 5, y demuestran que la accesibilidad media de los
- 35 dextranos se ha reducido drásticamente por el injerto del núcleo.

Tabla 5. Cromatografía por exclusión de tamaño inversa usando sondas de dextrano.

	Material de soporte	Prototipo 2D	Prototipo 2I
Dextrano, Pm	$K_{av}$	$K_{av}$	$K_{av}$
196000	0.38	0.04	0.03
123600	0.50	0.04	0.02
66700	0.62	0.04	0.01
21400	0.80	0.04	0.03
4440	0.95	0.08	0.14
1080	0.99	0.21	0.49

## Ejemplo 5 - Evaluación cromatográfica de prototipos de 96 micrómetros

- 40 Los prototipos de intercambiador catiónico se introdujeron en columnas y se inyectaron diferentes mezclas de proteínas estándar y se eluyeron a diferentes caudales. Se determinaron las anchuras de pico y resoluciones máximas

entre pares de proteínas particulares. Las capacidades dinámicas de unión se determinaron con beta-lactoglobulina.

Mezclas de proteínas de ensayo

Mezcla 1 - Un anticuerpo monoclonal IgG y citocromo C

Mezcla 2 - Conalbúmina, IgG policlonal, citocromo C y lisozima

5 Mezcla 3 - Un anticuerpo monoclonal IgG, citocromo C y lisozima

### Prototipos

Tabla 6. Se evaluaron prototipos de 90-96 micrómetros

Prototipo		Polímero injertado/acoplado (mg/ml)
1A	Núcleo de PVP/GDMA	77
1B	Núcleo de PVP/GDMA	97
1C	Núcleo de PVP/GDMA	81
1D	Núcleo de PVP/GDMA	97
1E	Núcleo de PVP	97
1F	Núcleo de PVP	126
Ref (SP FF)	Homogéneo	-

### Métodos

10 Los prototipos se introdujeron en columnas Tricorn 10/150 (GE Healthcare) con 10 mm de diámetro interno a alturas de lecho de 8 mm, a un caudal de envasado final de 3.0 ml/min.

Las columnas se equilibraron con 3 volúmenes de acetato de Na 50 mM pH 5.0 (tampón A) a 2 ml/min antes de la inyección de 200 microlitros de muestra a 1 ml/min. El lavado se realizó con 2 volúmenes de tampón A a 2 ml/min, antes de la elución con un gradiente de 15 volúmenes de columna de tampón A al 100% a tampón B a 100% (fosfato de Na 25 mM, pH 7.0 + NaCl 0.4 M) a 1 ml/min (1-3 ml/min en los ensayos de variación de caudal). Las columnas se eluyeron adicionalmente con 2 volúmenes de tampón B a 1/1-3 ml/min (es decir, velocidad de flujo 76 y 76-230 cm/h) y se reequilibraron con tampón A a 2 ml/min.

20 Para la determinación de la capacidad dinámica, las columnas se equilibraron con citrato 100 mM pH 3.0 y se cargó beta-lactoglobulina 3.8 mg/ml en citrato 100 mM pH 3.0 a 2 ml/min hasta que la absorbancia del efluente ( $A_{280}$ ) llegó al 20% de la absorbancia de alimentación ( $A_{280}$ ). Las columnas se limpiaron después con dos volúmenes de NaOH 1 M a 1 ml/min y se reequilibraron con citrato 100 mM pH 3.0.

25 Las columnas también se sometieron a ensayo en modo de no unión con citocromo C en Na-fosfato 50 mM pH 6.8 + NaCl 0.4 M a un caudal de 1 ml/min. Las columnas se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. Se midieron el volumen de la columna ( $V_c$ ), el volumen de elución del citocromo C ( $V_t$ ), la asimetría del pico ( $As$ ), el número de platos ( $N/m$ ) y la altura de plato ( $h$ ).

### Resultados

Tabla 7. Citocromo C, condiciones de no unión

Prototipo	Altura del lecho (cm)	$V_c$ (ml)	$V_t$ (ml)	$As$	$N/m$	Altura (cm)
1A	14.4	11.3	6	1.64	600	0.167
1B	15	11.8	5.82	1.83	476	0.21
1C	15.4	12.1	6.05	1.92	954	0.105
1D	15.6	12.3	5.86	1.77	1501	0.067
1E	15.3	12.0	5.7	1.78	1654	0.06
1F	14.6	11.5	5.33	2.18	1343	0.074
Ref (SP FF)	14.3	11	12.23	1.22	966	0.105

Los resultados del citocromo C en la Tabla 7 muestran que el volumen de retención  $V_t$  para los materiales de núcleo de PVP/GDMA y PVP es alrededor de la mitad del  $V_t$  para la referencia, lo que muestra que el citocromo C solo se retrasa en la envoltura de las perlas.

Tabla 8. Evaluación con la mezcla 1 de proteínas

Prototipo	$V_t$ de mAb (ml)	Anchura del pico de mAb (ml)	$V_t$ de cit C (ml)	Anchura del pico de cit C (ml)	Resolución
1A	77.5	4.09	107.5	3.15	4.9
1B	80.0	4.2	112.7	3.98	4.7
1C	74.5	3.2	110.8	2.51	7.5
Ref (SP FF)	93	6.8	126	4.99	3.35

5

Los resultados de la Tabla 8 y la Fig. 4 muestran que los prototipos dan picos considerablemente más estrechos y una resolución aumentada entre mAb y citocromo C en comparación con la referencia.

Tabla 9. Evaluación con la mezcla 2 de proteínas.

Prototipo	Resolución conal/cit C	Resolución cit C/lis	Anchura del pico de cit C (ml)	Anchura del pico de lis (ml)	$V_t$ de conal (ml)	$V_t$ de cit C (ml)	$V_t$ de lis (ml)
1A	2.29	2.6	3.8	4.4	78	118.9	136.8
1B	2.28	2.32	5	5.2	79.3	122.7	142.8
1C	2.91	3.84	3.2	4.2	77	122.5	146.6
1D	2.86	3.85	3.25	4.2	78.6	124.4	148.9
1E	3	4.08	3.03	3.67	76.5	121.4	144.6
1F	2.73	3.8	2.84	3.34	75.2	117.5	137.5
Ref (SP FF)	1.6	1.6	5.8	6.6	90.7	137.7	154.5

10 Como se muestra en la Tabla 9 y la Fig. 5, todos los prototipos de PVP/GDMA y PVP mostraron anchuras de pico considerablemente disminuidas y resolución aumentada en comparación con la referencia.

Tabla 10. Anchuras de pico para la mezcla de proteínas 3 a diferentes caudales.

Prototipo	Caudal (ml/min)	Anchura del pico de mAb (ml)	Anchura del pico de cit C (ml)	Anchura del pico de lis (ml)
1D	1	3.88	3.04	4.28
	2	4.31	3.49	5.04
	3	4.65	3.8	5.58
1E	1	3.66	2.83	3.93
	2	4.16	3.32	4.67
	3	4.56	3.69	5.28
1F	1	3.6	2.73	3.53
	2	4.12	3.2	4.23
	3	4.57	3.6	4.78
Ref (SP FF)	1	7.34	5.59	6.99
	2	9.53	7.42	9.29
	3	11.13	9.16	11.2

Tabla 11. Valores de resolución para la mezcla 3 de proteínas a diferentes caudales.

Prototipo	Caudal (ml/min)	Resolución mAb/cit C	Resolución cit C/lis
1D	1	6.19	3.93
	2	5.53	3.31
	3	5.13	2.97
1E	1	6.46	4.23
	2	5.67	3.44
	3	5.13	3.08
1F	1	5.94	3.99
	2	5.17	3.29
	3	4.63	2.92
Ref (SP FF)	1	3.11	1.58
	2	2.43	1.12
	3	2.05	0.91

Las Tablas 10 y 11 muestran que, de nuevo, los prototipos dan picos más estrechos y una resolución más alta que la referencia. También muestran que los prototipos son menos sensibles al ensanchamiento de pico y a la pérdida de resolución a caudales más altos en comparación con la referencia.

Tabla 12. Capacidades dinámicas a un 10% de ruptura (Qb 10%) con beta-lactoglobulina.

Prototipo	Qb 10% (mg/ml)
1D	38.6
1E	38.6
1F	38.5
Ref (SP FF)	106.8

Aunque los prototipos todavía tienen una capacidad de unión significativa, han perdido alrededor de 2/3 de la capacidad en comparación con la referencia. Se espera que esto pueda optimizarse variando el grosor de la envoltura y el contenido de ligando.

#### Ejemplo 6 - Evaluación cromatográfica de prototipos de 40 micrómetros

Los prototipos 2G y 2J y el material de referencia Capto SP ImpRes (intercambiador catiónico SP basado en perlas de agarosa altamente reticuladas de 40 micrómetros, con contenido de ligando homogéneo de 0.13-0.16 mmol/l) se introdujeron en columnas Tricorn 10/100 hasta alturas de lecho de 6.5 cm y volúmenes de lecho de 5.0 ml. Flujo de llenado 22-38 ml/min.

Las anchuras de pico se evaluaron mediante inyecciones de proteína única de citocromo C (4 mg/ml, 200 µl) y lisozima (4 mg/ml, 200 µl), con tampón A de acetato de Na 50 mM pH 5.0 y tampón B de fosfato de Na 25 mM pH 6.8 + NaCl 0.4 M y un gradiente lineal de tampón B al 0-100% de volumen de columna 15 a un caudal de 1.0 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación centrífuga. Los resultados se muestran en la Tabla 13 e indican que también estos prototipos disminuyeron la anchura del pico en comparación con la referencia homogénea.

Tabla 13. Prototipos de 40 micrómetros de anchura de pico

Prototipo	Anchura del pico de cit C (ml)	Anchura del pico de lis (ml)
2G	1.37	1.92
2J	1.18	1.56
Ref (SP ImpRes)	2.26	2.27

Las capacidades dinámicas (Qb 10%) se midieron con beta-lactoglobulina a velocidades de flujo de 76-306 cm/h y los resultados se muestran en la Tabla 14. La pérdida de capacidad fue de aproximadamente el 50% en comparación con la referencia.

5

Tabla 14. Capacidades dinámicas de prototipos de 40 micrómetros

Prototipo	Velocidad de flujo (cm/h)	Qb 10% (mg/ml)
2G	76	31.6
	153	31.7
	306	31.0
Ref (SP ImpRes)	76	64.6
	153	62.2
	306	64.9

Esta descripción escrita usa ejemplos para describir la invención, incluyendo el mejor modo, y también para permitir que cualquier persona experta en la técnica ponga en práctica la invención, incluyendo la fabricación y el uso de cualquier dispositivo o sistema y la realización de cualquier método incorporado. El alcance patentable de la invención está definido por las reivindicaciones.

10

## REIVINDICACIONES

1. Una matriz de separación para la purificación de biomacromoléculas, que comprende una pluralidad de partículas (1) que tienen una región de núcleo (2) y una región de envoltura (3), en la que: la región de núcleo y la región de envoltura comprenden ambas un material de soporte poroso, y dicha región de núcleo comprende un polímero de vinilamida injertado al material de soporte, comprendiendo dicho polímero de vinilamida residuos de al menos un monómero de vinilamida polimerizable, por lo que dicha región de envoltura es accesible a una biomacromolécula diana y dicha región de núcleo es menos accesible a dicha biomacromolécula diana que dicha región de envoltura según se determina mediante microscopía confocal como se describe en el Ejemplo 3 o mediante cromatografía por exclusión de tamaño inversa como se describe en el Ejemplo 4.
2. La matriz de separación de la reivindicación 1, en la que dicho material de soporte poroso comprende un polisacárido tal como agarosa o agar, que opcionalmente está reticulado.
3. La matriz de separación de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho polímero de vinilamida está injertado a dicho material de soporte poroso, tal como vía enlaces o enlazadores de estructura I, II, III, IV o V:
 

Sup-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Pol	(I)
Sup-O-CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-Pol	(II)
Sup-O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Pol	(III)
Sup-O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-Pol	(IV)
Sup-O-Pol	(V),

en las que Sup denota el material de soporte poroso y Pol el polímero vinílico.
4. La matriz de separación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho polímero de vinilamida comprende residuos de monómero de N-vinilpirrolidona.
5. La matriz de separación de cualquier reivindicación anterior, en la que dicha región de envoltura comprende ligandos capaces de unirse a dicha biomacromolécula diana.
6. La matriz de separación de la reivindicación 5, en la que dichos ligandos comprenden grupos cargados positiva o negativamente.
7. La matriz de separación de la reivindicación 5, en la que dichos ligandos comprenden grupos hidrófobos.
8. La matriz de separación de la reivindicación 5, en la que dichos ligandos comprenden grupos de afinidad.
9. La matriz de separación de la reivindicación 5, en la que dicha matriz de separación comprende ligandos multimodales, tales como ligandos seleccionados del grupo que consiste en N-bencil-N-metiletanolamina, N-benzoilhomocisteína, 4-mercaptoetilpiridina, ácido p-aminobenzamidoacético, triptófano y fenilalanina.
10. Un método de separación de una biomacromolécula diana, que comprende las etapas de:
  - a) proporcionar una muestra que comprende dicha biomacromolécula diana;
  - b) transportar dicha muestra a través de una columna rellena con la matriz de separación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores;
  - c) transportar opcionalmente un líquido de lavado a través de dicha columna; y
  - d) transportar un eluyente a través de dicha columna y recuperar dicha biomacromolécula diana en un eluato, en el que opcionalmente una velocidad de flujo a través de la columna en la etapa b) y/o d) es de al menos 70 cm/h.
11. El uso de la matriz de separación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para mejorar la resolución entre una biomacromolécula diana y al menos un contaminante, comprendiendo dicho uso opcionalmente el método de la reivindicación 10.



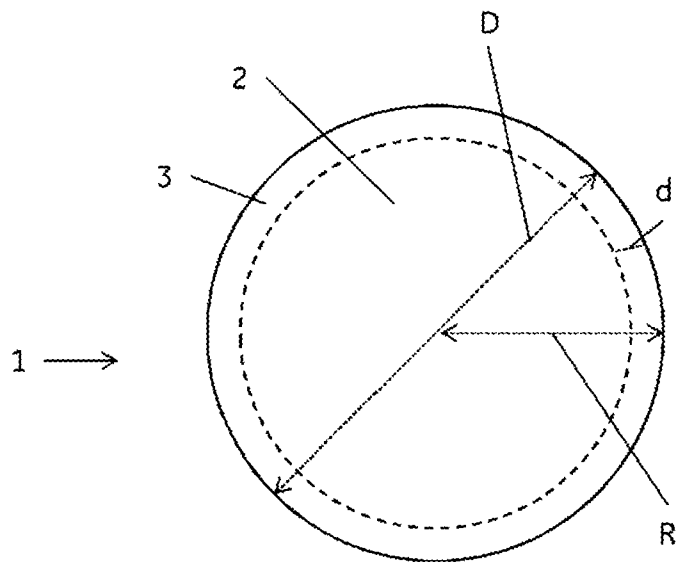


Fig. 1.

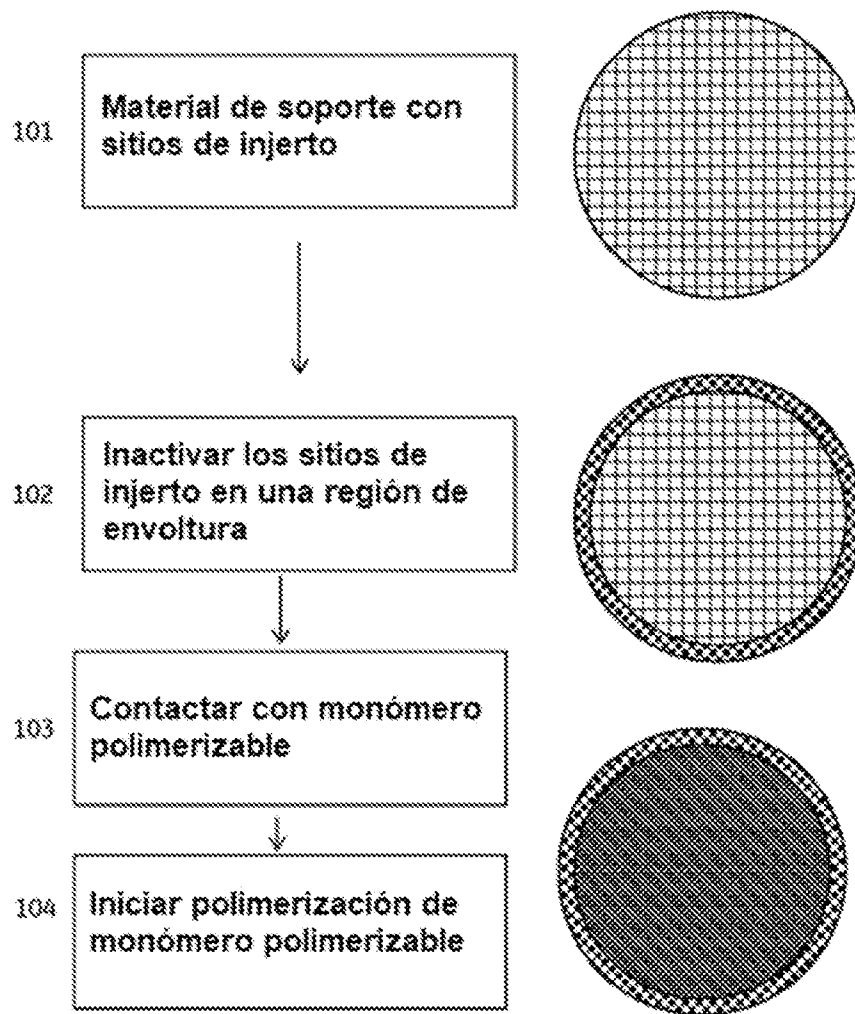


Fig. 2.

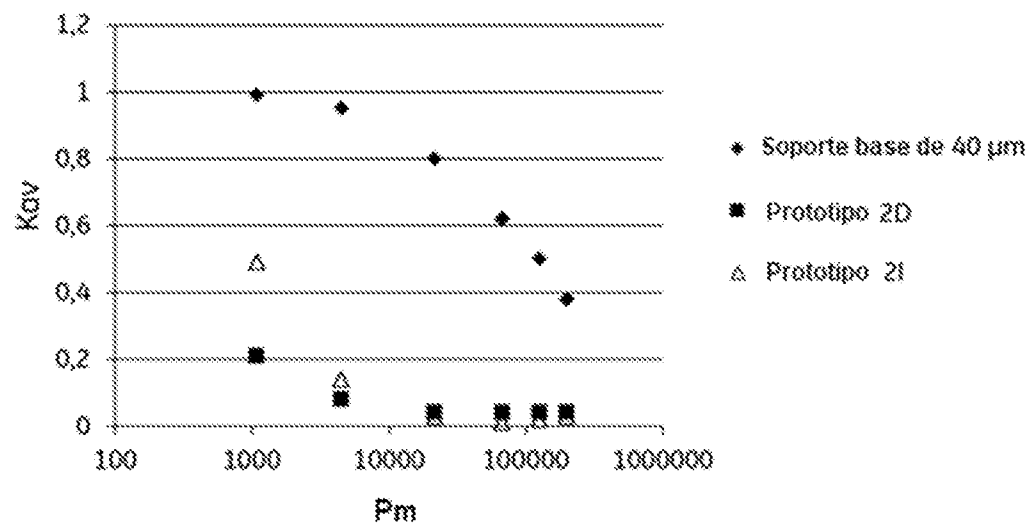


Fig. 3.

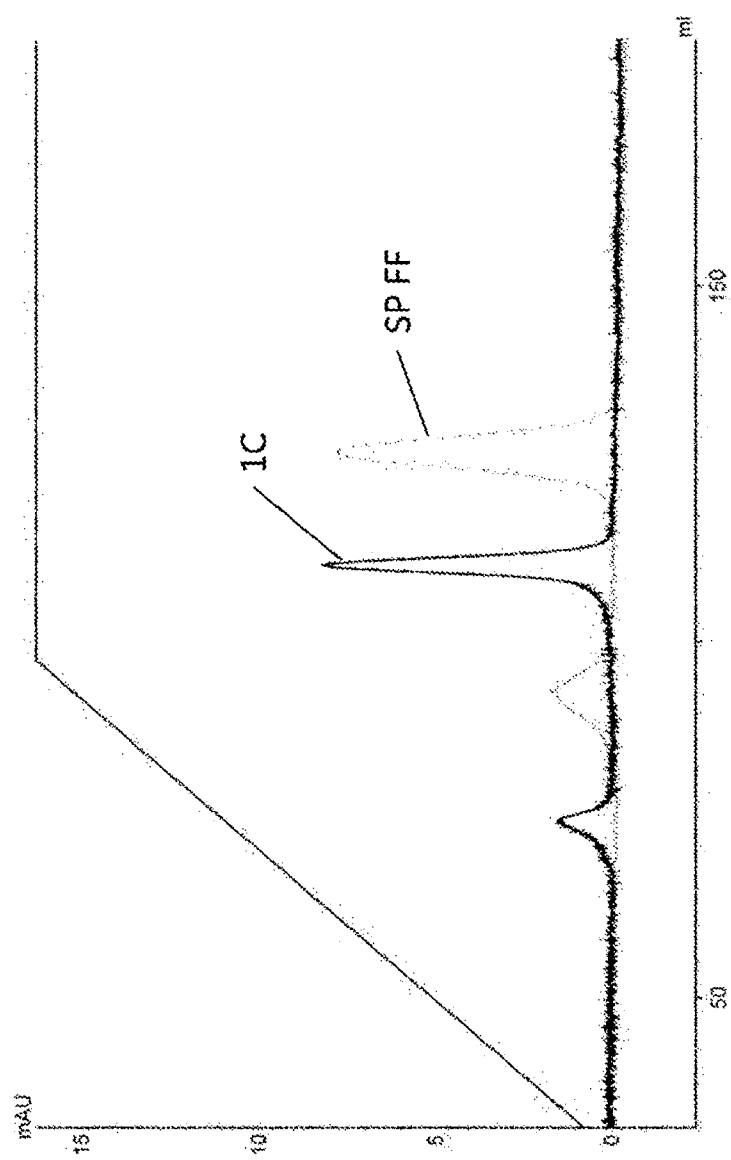


Fig. 4.

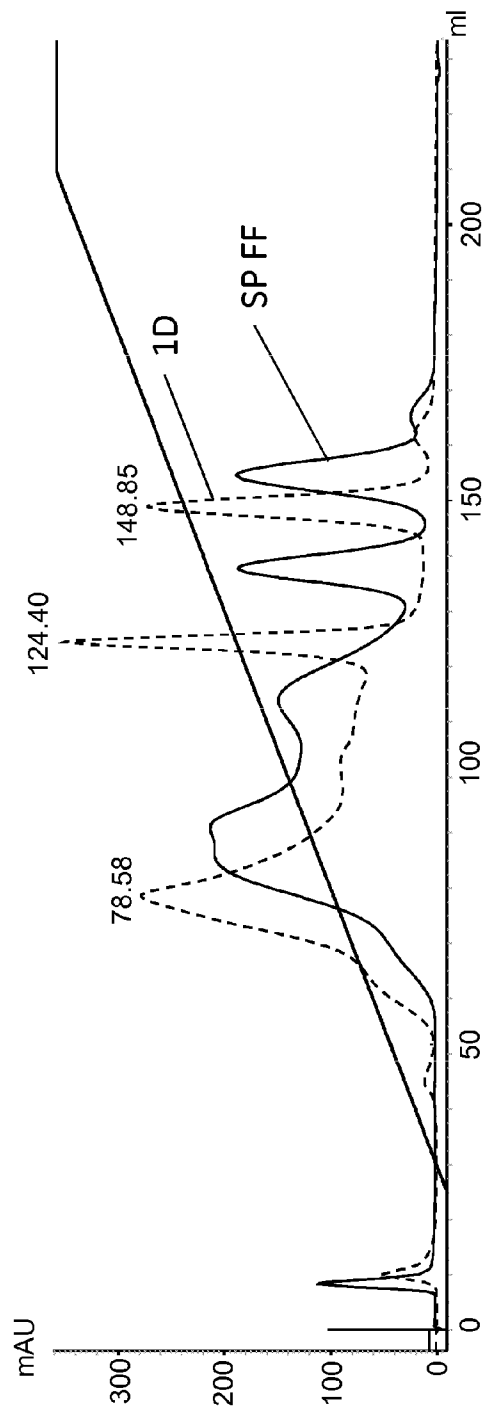


Fig. 5.

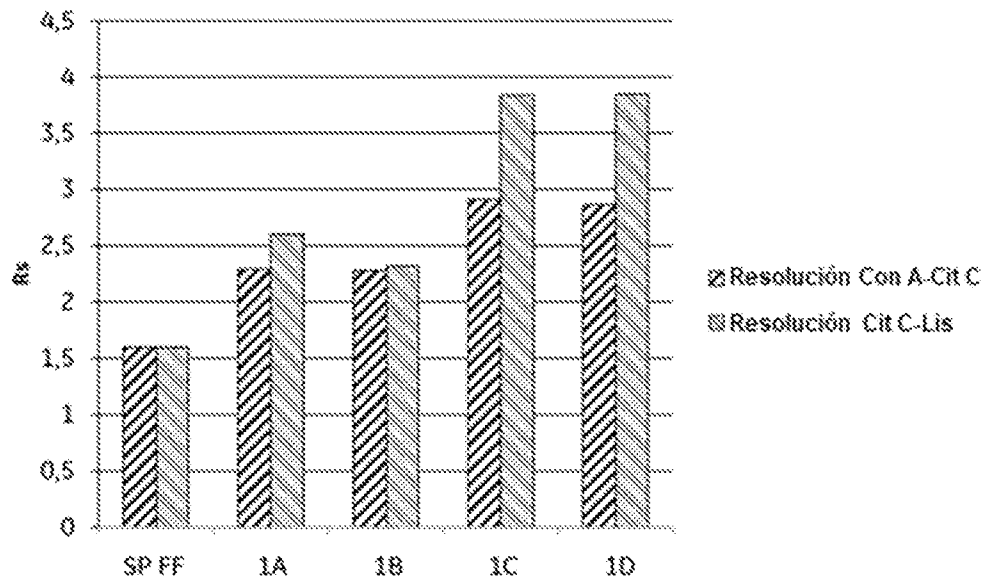
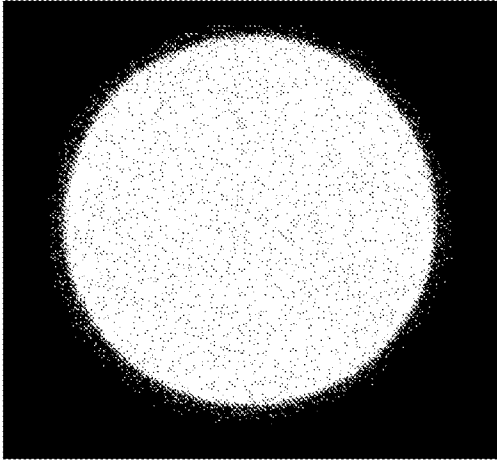
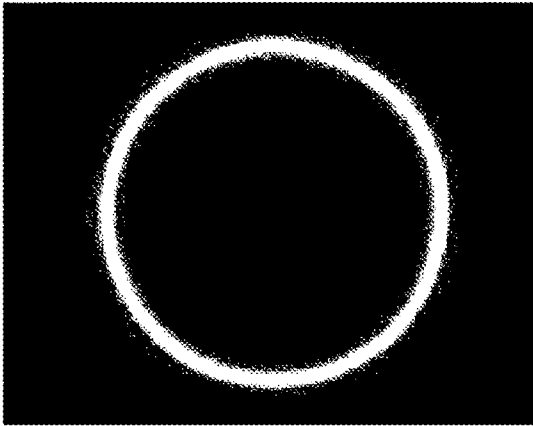


Fig. 6.



a)



b)

Fig. 7.

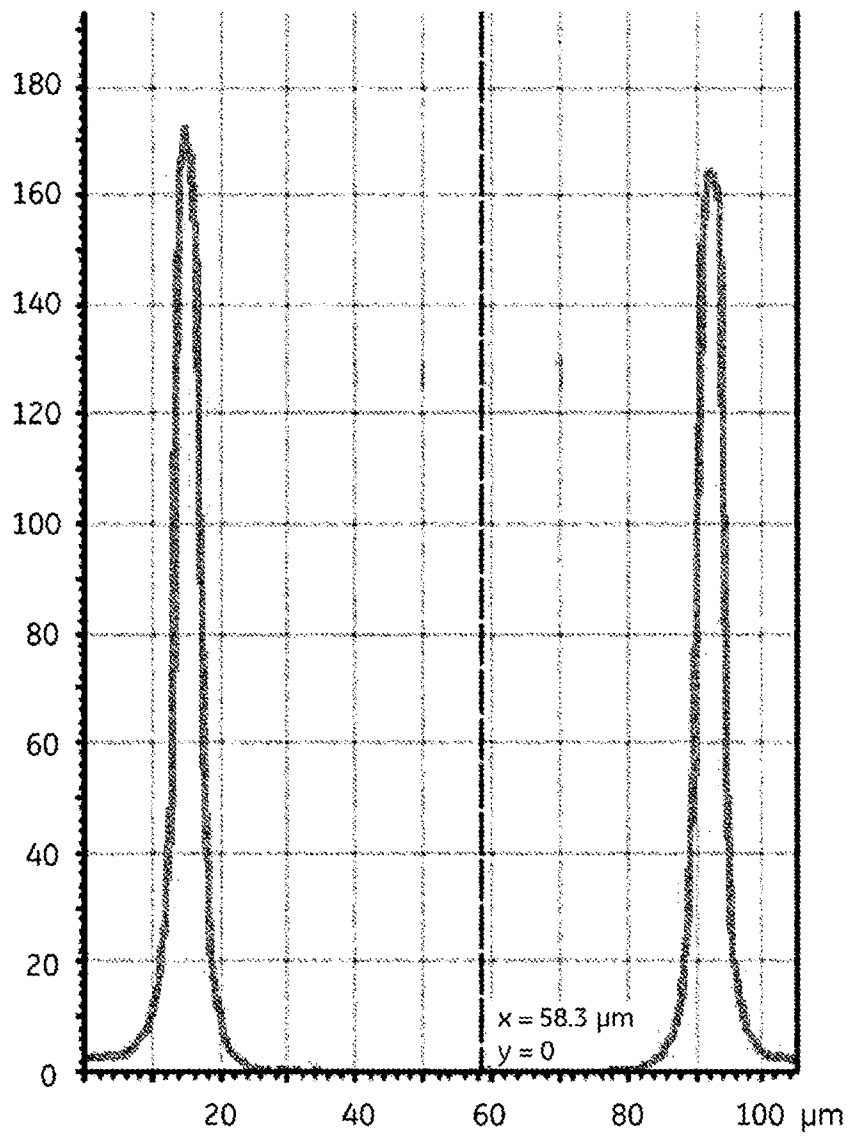


Fig. 8.