

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 526**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C12N 11/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2002 E 02706122 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 1373868**

54 Título: **Matrices de afinidad mejorada con visibilidad mejorada para aplicaciones de arrastre molecular e inmunoprecipitación**

30 Prioridad:

01.02.2001 US 265952 P

08.02.2001 US 267460 P

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

11.09.2015

73 Titular/es:

SIGMA-ALDRICH CO. LLC (100.0%)

3050 Spruce Street

St. Louis, MO 63103, US

72 Inventor/es:

WATSON, EDWARD B., III;

HEUERMANN, KENNETH E. y

DAPRON, JOHN G.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 545 526 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

Matrices de afinidad mejorada con visibilidad mejorada para aplicaciones de arrastre molecular e inmunoprecipitación

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0001] Los experimentos de arrastre molecular basado en la afinidad (captura de inmutafinidad) e inmunoprecipitación son procedimientos potentes y ampliamente utilizados para estudiar la expresión, modificación e interacción de las proteínas en una amplia variedad de sistemas biológicos. Los experimentos de arrastre molecular basado en la afinidad e inmunoprecipitación han dado como resultado la rápida purificación de proteínas recombinantes marcadas con epítomos, el descubrimiento y caracterización de modificaciones de proteínas postraduccionales reversibles, y una variedad de otras observaciones, que han aumentado la comprensión de los procesos biológicos en el nivel molecular.

15

[0002] La estrategia que subyace tras la técnica de arrastre molecular basado en la afinidad consiste en utilizar la afinidad de las biomoléculas como procedimiento para seleccionar moléculas diana a partir de una solución. Un ligando de afinidad, tal como un anticuerpo, se fija a una matriz en partículas, tal como agarosa, y el conjugado resultante se usa para localizar y unirse a su diana, tal como un antígeno en particular, a partir de una preparación biológica o bioquímica.

20

[0003] La inmunoprecipitación es un tipo de experimento de arrastre molecular basado en la afinidad. Los experimentos de arrastre molecular basado en la afinidad purifican por afinidad complejos usando cualquier ligando de afinidad que se conjuga directamente a un soporte polimérico que tiene una afinidad específica por determinadas dianas biomoleculares. Sin embargo, los procedimientos generales de un experimento de arrastre molecular basado en la afinidad se pueden ilustrar mediante los procedimientos involucrados en un experimento de inmunoprecipitación. El procedimiento básico de inmunoprecipitación implica tres etapas. La primera etapa es la preparación de la solución de antígeno. La segunda etapa consiste en la separación previa del lisado del fondo no específico, y la tercera etapa es la formación y la purificación de los inmunocomplejos. Una vez purificado, se puede aplicar cualquiera de una serie de procedimientos para analizar los antígenos. La variedad de procedimientos que se pueden utilizar específicamente en las técnicas de arrastre molecular basado en la afinidad e inmunoprecipitación se describen con detalle en el documento de Harlow, E. y Lane, D. (eds.), «Antibodies: a Laboratory Manual», Capítulo 7, Cold Spring Harbor Press, NY (1988).

30

[0004] La inmunoprecipitación se realiza generalmente en un lisado preparado a partir de células o tejido, aunque se puede utilizar cualquier solución acuosa como solución para realizar una inmunoprecipitación. Por lo general, el lisado se prepara a partir del tratamiento de las células o tejidos con algún tipo de detergente suave. El detergente suave resulta eficaz en la eliminación de las membranas, lo que interfiere con muchas interacciones intermoleculares débiles y libera la mayoría de los antígenos de la célula, sin alterar la conformación ni la actividad bioquímica de los antígenos de interés. Las interferencias causadas por las proteínas de unión no específicas se reducen al mínimo mediante el pretratamiento de la solución de antígeno con un anticuerpo que no se una al antígeno de interés con el fin de retirar las proteínas de unión no específicas.

40

[0005] Los inmunocomplejos se forman mediante la adición de anticuerpos específicos al lisado. Los anticuerpos tienen una alta afinidad para sus respectivos antígenos, de manera que los complejos antígeno-anticuerpo se forman rápidamente. Seguidamente, los complejos se purifican mediante la adición de una suspensión de microesferas de afinidad, tal como una suspensión de microesferas de proteína A o proteína G, a la solución que contiene los complejos antígeno-anticuerpo. La purificación se produce porque la proteína A y la proteína G tienen una alta afinidad por la región Fc del anticuerpo. Una vez que el complejo se ha unido a la microesfera a través de la interacción proteína A/G-anticuerpo, las microesferas se recogen por centrifugación y las proteínas no unidas se retiraron por lavado de las microesferas. Las microesferas se pueden lavar mediante enjuague con una solución tal como tampón de lisis y retirada del lisado y del tampón de lavado por aspiración. Es importante la retirada completa del tampón de lavado con el fin de reducir el fondo y mejorar la eficacia del inmunoensayo. Una vez completada la formación y la purificación de los inmunocomplejos, las proteínas inmunoprecipitadas resultantes pueden ser objeto de análisis adicionales. Con frecuencia, la siguiente etapa consiste en la separación de proteínas mediante SDS-PAGE.

50

[0006] Una desventaja importante de los procedimientos de arrastre molecular basado en la afinidad e inmunoprecipitación según se ponen en práctica de manera habitual es que la matriz de afinidad es difícil de

visualizar en los tubos utilizados en las etapas de formación y purificación del complejo. Esta dificultad en la visualización conduce a manipulaciones ineficientes y se traduce en la pérdida de material y la variabilidad cuantitativa de los resultados. Por ejemplo, las microesferas de agarosa o de poliacrilamida generalmente son no coloreadas, es decir, translúcidas o blancas, y son difíciles de visualizar en los tubos, lo que hace que las manipulaciones durante el procedimiento resulten pesados. Debido a esta mala visibilidad, las microesferas se pueden perder durante la aspiración del sobrenadante de lisado durante el procedimiento de retirada de las proteínas no unidas. Además, es posible que se produzca la retirada accidental de las microesferas de agarosa o poliacrilamida de los tubos durante las etapas de lavado y aspiración como consecuencia de la mala visibilidad de las microesferas. Las dificultades e inexactitudes provocadas por la falta de visibilidad de las microesferas son las principales limitaciones de los experimentos de arrastre molecular basado en la afinidad e inmunoprecipitación. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad sustancial de una adaptación que pueda mejorar la visibilidad de la matriz de afinidad sin alterar su funcionamiento en el procedimiento de arrastre molecular o inmunoprecipitación. Tal adaptación facilitaría en gran medida la manipulación de la matriz de afinidad para la persona encargada de realizar el procedimiento de arrastre molecular o inmunoprecipitación. La mejora de la manipulación se traduciría en una mayor eficiencia de las manipulaciones y reduciría la pérdida de material y la variabilidad cuantitativa de los resultados. En resumen, dicha adaptación mejoraría la eficiencia y la fiabilidad de afinidad de los procedimientos de arrastre molecular basado en la afinidad e inmunoprecipitación.

[0007] La afinidad de ciertos colorantes por las proteínas se conoce y utiliza desde hace algún tiempo en diversas aplicaciones. Desde hace mucho tiempo, los colorantes se utilizan como ligandos de afinidad para la purificación de proteínas en la cromatografía de afinidad. La cromatografía de afinidad es un procedimiento que separa una sustancia de una mezcla en virtud del reconocimiento y la afinidad bioespecíficos (que implican interacciones no covalentes) de dicha sustancia por un ligando inmovilizado en un soporte. Los colorantes que se han utilizado para purificar proteínas fueron desarrollados originalmente para su aplicación en la industria textil. Estos colorantes incluyen colorantes de triazina que se basan en la química del cloruro cianúrico (1,3,5-triclorotriazina). Los colorantes de triazina se han utilizado como ligandos para cromatografía de afinidad, ya que ofrecen ventajas en términos tanto de la preparación como del uso, en comparación con la opción más convencional de usar coenzima inmovilizada y diversos otros medios biológicos específicos de grupo. Entre estas ventajas se incluyen una capacidad de unión a proteínas que puede ser significativamente mayor que la de los medios bioespecíficos naturales, bajo coste, disponibilidad general y facilidad de preparación. Véase, por ejemplo, el documento de Christopher R. Lowe y James C. Pearson, *Affinity Chromatography on Immobilized Dyes, Methods In Enzymology*, Vol. 104, 97-113 (1984).

[0008] La patente de EE. UU. n.º 5.597.485 describe un procedimiento para la separación de proteínas usando una composición polimérica que incluye un polímero formado a partir de al menos un monómero que contiene un radical polimerizable unido químicamente a un colorante orgánico aniónico sintético. El colorante tiene afinidad por la proteína que se desea separar. El procedimiento para la separación de las proteínas incluye la retención de la proteína en la fracción de colorante y, posteriormente, la recuperación de la proteína a partir del polímero. El procedimiento es aplicable a la cromatografía de afinidad, pero no se limita a las columnas cromatográficas. El procedimiento consiste en poner en contacto el polímero con la solución que contiene la proteína que se desea separar y separar las partículas coloreadas de la solución por medio de filtración, centrifugación o medios similares. No obstante, el procedimiento utiliza deliberadamente colorantes que poseen una afinidad específica por la proteína que se desea separar, y la proteína se aísla y se purifica al unirse específicamente a este colorante.

[0009] La patente 4.546.161 da a conocer un procedimiento de producción de medios de cromatografía de afinidad mediante la reacción de colorantes de mono o dicloro triazina con una matriz de soporte sólido que posee grupos hidroxilo o amino libres. La matriz de soporte sólido es un polímero o copolímero de agarosa, dextrana, dextrano o acrilamida. Los colorantes se hacen reaccionar en presencia de un hidróxido de metal alcalino y una sal de metal alcalino. Los colorantes se unen a la matriz de soporte sólido a través del anillo de triazina, proporcionando una capacidad de unión a proteínas alta y específica. Los medios están diseñados específicamente para su uso en cromatografía de afinidad para el aislamiento y purificación eficaces y altamente específicos de proteínas usando colorantes de triazina seleccionados para unirse específicamente a las proteínas de interés.

[0010] De manera similar, la patente de EE. UU. n.º 4.880.915 da a conocer un procedimiento para la purificación de una proteína específica, el FNT humano, que consiste en aplicar una solución que contiene el FNT humano a una columna rellena con un gel de agarosa reticulada unido a un colorante, eluir la columna para liberar el FNT humano unido, y recuperar una fracción de columna de FNT humano purificado. El gel de agarosa reticulada comprende un soporte de gel de agarosa reticulada al que está unido covalentemente un ligando de colorante. El ligando de

colorante es Cibacron Blue F3GA, Procion Red HE3B o Green A y el FNT humano queda retenido al interaccionar específicamente con el ligando de colorante. Los colorantes también se han utilizado por su capacidad para mejorar la visibilidad de una sustancia en la aplicación específica de la precipitación de ácidos nucleicos. La patente WO 97/12994 da a conocer un procedimiento para la precipitación de un ácido nucleico soluble a partir de una solución mediante la adición de una molécula portadora polimérica que está acoplada a una molécula indicadora. La técnica de precipitación de ácidos nucleicos es a menudo propensa a sufrir un fracaso impredecible debido a la pérdida de sedimentos de ácido nucleico precipitados durante la retirada de las fases de sobrenadante, debido a la falta de visibilidad de los sedimentos de ácido nucleico. Los ácidos nucleicos se precipitan mediante la adición de una cantidad suficiente de sal y alcohol a la solución acuosa para causar que los ácidos nucleicos precipiten desde la solución. El alcohol y la sal son ingredientes habituales para la técnica de precipitación de ácidos nucleicos, y el etanol es el alcohol más comúnmente utilizado en el procedimiento.

[0011] La molécula portadora modificada dada a conocer en la patente WO 97/12994 tiene las mismas propiedades de solubilidad y precipitación que la molécula sin modificar y precipita conjuntamente con el ácido nucleico, pero se visualiza fácilmente y permite al usuario observar la ubicación del ácido nucleico en la muestra tratada. Las propiedades de solubilidad y precipitación de tanto la molécula sin modificar como modificada son específicas de las técnicas de precipitación y centrifugación utilizadas generalmente en la precipitación de ácidos nucleicos. En concreto, los ácidos nucleicos son solubles en más soluciones acuosas y se agregan cuando se reduce la constante dieléctrica de las soluciones acuosas, por ejemplo mediante la adición de alcohol a la solución acuosa. La agregación hace que los ácidos nucleicos posean colectivamente una masa suficiente como para precipitar desde la solución acuosa. El precipitado se ha de separar de la solución acuosa sometiendo la solución a una centrifugación a alta velocidad de alrededor de 5000 g durante un período de alrededor de cinco minutos. Por lo tanto, la molécula portadora modificada no sería utilizable en experimentos alternativos, y en la patente WO 97/12994 no se incluye sugerencia alguna de que la molécula portadora modificada sería aplicable a técnicas alternativas. Más bien, el procedimiento y la molécula portadora están limitados específicamente a técnicas de precipitación de ácidos nucleicos.

[0012] La patente de EE. UU. n.º 5.232.830 da a conocer procedimientos y composiciones para detectar un elemento de un par de ligandos sobre un soporte sólido que tiene fluorescencia intrínseca. Un elemento diana de un par de ligandos se pone en contacto con un elemento de captura de un par de ligandos, en donde el elemento de captura está inmovilizado sobre un soporte sólido que tiene fluorescencia intrínseca, y el par contactado está asociado con un indicador colorimétrico; seguidamente, se irradia el soporte sólido y se determina la fluorescencia resultante.

[0013] La patente EP 407188 describe un reactivo útil en inmunoensayos, que comprende micropartículas de poliestireno que contienen en su interior un fluoróforo insoluble en agua tal como un colorante láser. El fluoróforo está esencialmente ausente en las superficies de las partículas. Las partículas se pueden sensibilizar con reactivos de unión específicos, tales como anticuerpos.

[0014] La patente de EE. UU. n.º 4.166.105 da a conocer reactivos útiles para la detección de reactivos específicos, tales como antígenos en fluidos biológicos, que comprenden un polímero acoplado a un anticuerpo. El polímero tiene una pluralidad de moléculas de colorante acopladas al mismo. El reactivo se prepara uniendo covalentemente un grupo funcional terminal de polímeros a un anticuerpo. Las moléculas de colorante se acoplan al polímero a través de sitios reactivos secundarios.

[0015] La patente de EE. UU. n.º 5.030.697 da a conocer colorantes unidos a polímeros.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

[0016] Entre los objetos de la invención se encuentra dar a conocer una matriz de afinidad, que tiene una capacidad de unión no específica a proteínas relativamente baja que se pueda monitorizar más fácilmente durante experimentos de arrastre molecular basado en la afinidad con el fin de evitar la pérdida accidental de matriz de afinidad durante la separación y, por consiguiente, mejorar la recuperación cuantitativa de los complejos de afinidad.

[0017] La presente invención está dirigida a una matriz de afinidad para el aislamiento de una molécula de una solución acuosa, comprendiendo la matriz de afinidad un soporte polimérico en partículas, un colorante unido covalentemente a una fracción del soporte polimérico para permitir la detección óptica del soporte polimérico, y un ligando de afinidad distinto del colorante unido a una fracción del soporte polimérico para la captura de una molécula, en donde los ligandos de afinidad y el colorante están asociadas a diferentes fracciones del material en

partículas.

[0018] La presente invención se refiere además a un procedimiento para el aislamiento de una biomolécula de una solución acuosa. El procedimiento consiste en combinar la solución acuosa con una matriz de afinidad que comprende un soporte polimérico y separar la matriz de afinidad de la solución acuosa. Un colorante se une a una fracción del soporte polimérico, lo que permite la detección óptica y la monitorización de la matriz de afinidad y, en consecuencia, reduce la probabilidad de que se produzca la pérdida de matriz de afinidad durante la etapa de separación. Además, un ligando de afinidad distinto del colorante también se une a una fracción del soporte polimérico para la captura de la biomolécula.

[0019] Otros objetos resultarán en parte evidentes y en parte se expondrán en lo sucesivo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0020] Tal como se usa en el presente documento, «polímero coloreado» o «soporte polimérico coloreado» se refiere a materiales poliméricos a los que se han unido colorantes. Estos colorantes son preferentemente colorantes que son inherentemente colorantes de baja capacidad de unión a proteínas o que han sido modificados para ser de baja capacidad de unión a proteínas. Los términos «polímero no coloreado» o «soporte polimérico no coloreado» se refiere a soportes poliméricos, tales como agarosa reticulada, a los que no se han unido colorantes. Los términos «polímero coloreado» o «soporte polimérico coloreado» se refieren a un soporte polimérico al que se ha unido un colorante. Una «matriz de afinidad coloreada» es una matriz de afinidad que contiene un soporte polimérico coloreado.

[0021] En una realización, la matriz de afinidad de la presente invención comprende un material polimérico en partículas al que se han unido colorante y un ligando de afinidad para una biomolécula u otra molécula de interés. En general, la matriz de afinidad comprende

(i) material polimérico en partículas al que está unido el colorante, pero no el ligando de afinidad, (ii) material polimérico en partículas al que está unido el ligando de afinidad, pero no el colorante.

[0022] Así, por ejemplo, la matriz de afinidad comprende

(i) una mezcla de materiales en partículas en donde algunas de las partículas de la mezcla contienen colorante y otras partículas contienen ligando de afinidad, pero ninguna de las partículas contienen tanto el colorante como el ligando de afinidad.

[0023] Preferentemente, los ligandos de afinidad y el colorante están asociados a fracciones separadas del material polimérico en partículas. Por ejemplo, el colorante puede estar unido a entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 50 % en peso del material polimérico en partículas que comprende la matriz de afinidad, y el ligando de afinidad está unido al resto del material polimérico en partículas que define la matriz de afinidad, es decir, a entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 99 % en peso del material polimérico en partículas que comprende la matriz de afinidad. Más preferentemente, el colorante está unido a entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 15 % en peso del material polimérico en partículas que comprende la matriz de afinidad, y el ligando de afinidad está unido al resto del material polimérico en partículas que comprende la matriz de afinidad, es decir, a entre aproximadamente el 85 % y aproximadamente el 99 % en peso del material polimérico en partículas que comprende la matriz de afinidad. Aún más preferentemente, el colorante está unido a entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 10 % en peso del material polimérico en partículas que comprende la matriz de afinidad, y el ligando de afinidad está unido al resto del material polimérico en partículas que comprende la matriz de afinidad, es decir, a entre aproximadamente el 90 % y aproximadamente el 98 % en peso del material polimérico en partículas que comprende la matriz de afinidad. En general, las proporciones relativas de las dos fracciones depende de la intensidad del color (determinado ópticamente o visualmente) del colorante y su capacidad, cuando está unido al material en partículas, para la unión no específica a proteínas; por ejemplo, los colorantes que proporcionan al material en partículas al que están unidos una mayor capacidad de unión no específica a proteínas se usan preferentemente en una proporción menor que los colorantes que proporcionan al material en partículas al que están unidos una menor capacidad de unión no específica a proteínas.

[0024] Los colorantes utilizados en la invención son preferentemente colorantes que tienen una capacidad de unión a proteínas relativamente baja cuando están unidos a un soporte polimérico. En general, estos colorantes están acoplados covalentemente a un soporte polimérico; en consecuencia, preferentemente los colorantes o bien

poseen un grupo reactivo o bien son capaces de ser modificados para proporcionar un grupo reactivo que permita el acoplamiento covalente a un soporte polimérico. Entre los ejemplos de grupos reactivos se incluyen, entre otros, mono y dicloro triazinas, grupos vinilsulfona, grupos monocloro difluoro pirimidínicos, β -sulfatoetilsulfona e isotiocianato. Azo, antraquinona y ftalocianina son los tres principales tipos de cromóforos que predominan en las gamas de colorantes reactivos. Los colorantes utilizados en la invención pueden impartir al soporte polimérico cualquier color, siempre que, cuando el colorante esté unido al polímero, una matriz de afinidad que comprenda el soporte polimérico al que el colorante se ha unido sea ópticamente detectable y, preferentemente, fácilmente visible a simple vista en luz ambiente.

- 10 **[0025]** Entre los colorantes adecuados se incluyen también aquellos colorantes que están fuera del ámbito de los colorantes colorimétricos que son visibles a simple vista, tales como los colorantes fluorescentes, que requieren de una excitación por una luz con una longitud de onda apropiada para su visualización. Los colorantes fluorescentes imparten una sensibilidad de detección mucho mayor, lo cual puede ser importante cuando se trabaja con cantidades muy pequeñas de matriz de afinidad. Un ejemplo sería una matriz de afinidad fluorescente usada en un experimento de arrastre molecular como preparación para un análisis de espectrometría de masas (MALDI). La muestra de la matriz de afinidad se puede aplicar directamente al portaobjetos con la diana de MALDI, con tan solo unos pocos microlitros por aplicación. La presencia de la muestra de matriz de afinidad en la diana de MALDI se pudo determinar visualmente por fluorescencia tras la exposición a una luz con una longitud de onda adecuada.
- 15 20 **[0026]** Las moléculas fluorescentes emiten fotones desde los estados electrónicos excitados y se caracterizan por sus espectros de absorción/excitación y de emisión. Los colorantes fluorescentes pueden presentar una emisión fluorescente de corta duración o de larga duración y, además, se caracterizan por el desplazamiento de Stokes y el rendimiento cuántico. El isotiocianato de fluoresceína representa un marcador fluorescente reactivo comúnmente utilizado que tiene una emisión de corta duración, posee un desplazamiento de Stokes relativamente estrecho y tiene un rendimiento cuántico relativamente alto. La rodamina es otro colorante fluorescente de uso habitual, que emite a una longitud de onda más larga que la fluoresceína. Los quelatos de metal lantánido representan una clase de compuestos fluorescentes que poseen un desplazamiento de Stokes relativamente grande y gozan de una emisión fluorescente de larga duración. Esta importante clase de moléculas fluorescentes por lo general requiere otra molécula que absorba fuertemente para transferir la energía luminosa y así inducir una potente fluorescencia.
- 25 30 Entre los ejemplos de metales lantánidos se pueden citar el terbio y el europio, que habitualmente se presentan quelados por un quelato polidentado. Otros ejemplos de compuestos fluorescentes incluyen naftalenos, pirenos, derivados de cumarina, derivados de piridiloxazol y complejos de rutenio.

- [0027]** En términos generales, el colorante unido al soporte polimérico puede ser uno (o más) que intrínsecamente tenga(n) una baja capacidad de unión a proteínas o puede ser uno (o más) que haya(n) sido modificado para tener una baja capacidad de unión a proteínas cuando está(n) unido(s) a un soporte polimérico, o combinaciones de los mismos. Preferentemente, la matriz de afinidad comprende un colorante que intrínsecamente tiene una baja capacidad de unión a proteínas. En cualquier caso, el colorante o los colorantes seleccionados preferentemente no aumentan significativamente la capacidad de unión no específica a proteínas de la matriz de afinidad; de lo contrario, las ventajas de la detección óptica mejorada y de la monitorización de la matriz de afinidad se verían más que compensadas por la unión no específica a proteínas durante el procedimiento de arrastre molecular o inmunoprecipitación. Por ejemplo, la capacidad de la matriz de afinidad, sobre una base de peso, para la unión no específica de proteínas presentes en un lisado de una célula de mamífero de origen natural en condiciones fisiológicas de sales y pH es menor que 100 veces la capacidad de una matriz de referencia en las mismas condiciones, en donde la matriz de referencia es sustancialmente idéntica a la matriz de afinidad, excepto porque el colorante no está unido al material en partículas de la matriz de referencia. Preferentemente, la capacidad de la matriz de afinidad, sobre una base de peso, para la unión no específica de proteínas presentes en un lisado de una célula de mamífero de origen natural en condiciones fisiológicas de sales y pH es menor que 50 veces la capacidad de la matriz de referencia en las mismas condiciones. Más preferentemente, la capacidad de la matriz de afinidad, sobre una base de peso, para la unión no específica de proteínas presentes en un lisado de una célula de mamífero de origen natural en condiciones fisiológicas de sales y pH es menor que 10 veces la capacidad de la matriz de referencia en las mismas condiciones. Aún más preferentemente, la capacidad de la matriz de afinidad, sobre una base de peso, para la unión no específica de proteínas presentes en un lisado de una célula de mamífero de origen natural en condiciones fisiológicas de sales y pH es menor que 3 veces la capacidad de una matriz de referencia en las mismas condiciones.
- 35 40 45 50 55

[0028] Los colorantes de baja capacidad de unión a proteínas se seleccionan preferentemente entre colorantes azoicos que poseen cromóforos, cromóforos de antraquinona y cromóforos de ftalocianina. Más preferentemente, los colorantes representativos que poseen intrínsecamente una baja capacidad de unión a proteínas cuando están

unido a un soporte polimérico se pueden seleccionar entre la familia Remazol de colorantes, colorantes que poseen una sulfona de vinilo, la familia Procion de colorantes, colorantes que poseen una mono o dicloro triazina, y la familia de colorantes Drimarene, colorantes que poseen un anillo monocloro difluoro pirimidínico. Entre los ejemplos de colorantes de baja capacidad de unión a proteínas adecuados se incluyen, entre otros, ácido 5-[(4,6-dicloro-1,3,5-triazin-2-il)amino]-4-hidroxi-3-(fenilazo)-2,7-naftalenodisulfónico, sal disódica (Procion Red MX-5B); Procion Blue MXR; Remazol Violet R-4B; Procion Red MX-BRA; ácido 5-(acetilamino)-4-hidroxi-3-[[2-hidroxi-4-[[2-(sulfooxi)etil]sulfonil]fenil]azo]-2,7-naftalenodisulfónico, complejo de cobre (Remazol Brilliant Violet 5R); Procion Red MX-GBA; Blue MX-4RD (Navy Blue 21); Blue MX-2G (Cobalt Blue 22); Dharma Fire Red 10; ácido 6-(acetilamino)-4-hidroxi-3-[[3-[[2-(sulfooxi)etil]sulfonil]fenil]azo]-2-naftalenodisulfónico, sal disódica (Remazol Brilliant Orange 3R; Reactive Orange 16); Remazol Brilliant Red BB (Reactive Red 21); Procion Turquoise H-A; Remazol Brilliant Scarlet R-3G; Remazol Brilliant Orange R-FN; y Reactive Blue 21. Entre los colorantes de baja capacidad de unión a proteínas preferentes para su uso en la invención se incluyen, entre otros, ácido 6-(acetilamino)-4-hidroxi-3-[[3-[[2-(sulfooxi)etil]sulfonil]fenil]azo]-2-naftalenodisulfónico, sal disódica (Remazol Brilliant Orange 3R, Reactive Orange 16), Remazol Brilliant Red BB (Reactive Red 21), Procion Turquoise H-A, Remazol Brilliant Scarlet R-3G, Remazol Brilliant Orange R-FN, Remazol Violet R-4B, ácido 5-(acetilamino)-4-hidroxi-3-[[2-hidroxi-4-[[2-(sulfooxi)etil]sulfonil]fenil]azo]-2,7-naftalenodisulfónico, complejo de cobre (Remazol Brilliant Violet 5R), y Reactive Blue 21. Entre los colorantes de baja capacidad de unión a proteínas más preferentes se incluyen, entre otros, ácido 6-(acetilamino)-4-hidroxi-3-[[3-[[2-(sulfooxi)etil]sulfonil]fenil]azo]-2-naftalenodisulfónico, sal disódica (Remazol Brilliant Orange 3R, Reactive Orange 16), Remazol Brilliant Red BB (Reactive Red 21), Remazol Brilliant Scarlet R-3G, Remazol Brilliant Orange R-FN, y Reactive Blue 21. Entre los colorantes de baja capacidad de unión a proteínas aún más preferentes se incluyen, entre otros, Remazol Brilliant Red BB (Reactive Red 21) y ácido 6-(acetilamino)-4-hidroxi-3-[[3-[[2-(sulfooxi)etil]sulfonil]fenil]azo]-2-naftalenodisulfónico, sal disódica (Remazol Brilliant Orange 3R, Reactive Orange 16).

[0029] La baja capacidad de unión a proteínas también se puede conseguir mediante la modificación de un colorante de manera que tenga una baja capacidad de unión a proteínas. Estos colorantes también se pueden seleccionar generalmente entre colorantes azoicos que poseen cromóforos, cromóforos de antraquinona y cromóforos de ftalocianina. Asimismo, se pueden usar colorantes que no están en el espectro visible, tales como colorantes fluorescentes y colorantes que son visibles en el espectro UV o en el espectro IR. Preferentemente, los colorantes se pueden seleccionar entre la familia Remazol de colorantes, colorantes que poseen un grupo reactivo de sulfona de vinilo, la familia Procion de colorantes, colorantes que poseen un grupo mono o dicloro triazina, y la familia de colorantes Drimarene, colorantes que poseen un anillo monocloro difluoro pirimidínico. Entre los ejemplos de colorantes con capacidad de unión a proteínas se incluyen, entre otros, Reactive Brown 10 y Reactive Red 120. Entre las modificaciones que pueden hacer que un colorante tenga una baja capacidad de unión a proteínas se pueden incluir la absorción de gelatina y la reticulación. La absorción de gelatina y la reticulación bloquean físicamente los sitios en los que el colorante con capacidad de unión a proteínas se une a las proteínas. Por lo tanto, el colorante se une a un menor número de proteínas debido a que los sitios en los que se une a las proteínas quedan bloqueados por la gelatina. La gelatina actúa bloqueando los propios sitios de unión a proteínas del colorante con capacidad de unión a proteínas que está unido al soporte polimérico y la reticulación actúa para fijar la gelatina de bloqueo sobre el soporte polimérico. La absorción de gelatina y la reticulación se pueden lograr mediante la saturación del soporte polimérico coloreado en una gelatina en una preparación acuosa y, seguidamente, llevando a cabo la reticulación con un reactivo apropiado, tal como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Se aplicó este procedimiento para acoplar gelatina a una matriz de agarosa en forma de microesferas con Reactive Red 120 unido covalentemente. Las modificaciones apropiadas para este procedimiento y la selección de diferentes procedimientos podrían ser realizadas en su conjunto por un experto en la materia que esté familiarizado con las modificaciones necesarias para bloquear la capacidad de unión a proteínas y los procedimientos con las que se lleva a cabo.

[0030] La cantidad de colorante que se puede acoplar al soporte polimérico puede variar considerablemente, dependiendo de los objetivos del experimento de inmunoprecipitación o de arrastre molecular basado en la afinidad en particular. Los límites superiores de la cantidad de colorante que se puede acoplar al soporte polimérico son aquellas cantidades que puedan alterar o poner en riesgo el funcionamiento del soporte polimérico. Los límites inferior quedan establecidos por la cantidad de colorante que permite que el soporte polimérico sea detectado óptica o visiblemente, por ejemplo, por visibilidad en luz ambiente. Otras consideraciones pertinentes de cara a la elección de la cantidad de colorante que ha de acoplarse al soporte polimérico incluyen la capacidad del soporte polimérico coloreado para ser modificado adicionalmente con ligandos de afinidad. La evaluación de estas variables y la elección de una cantidad apropiada de colorante que ha de acoplarse al soporte polimérico para cumplir los objetivos de un experimento de inmunoprecipitación o de arrastre molecular en particular se encuentran dentro de los conocimientos de un experto en la materia.

[0031] Generalmente, sin embargo, la cantidad de colorante que se puede acoplar al soporte polimérico está comprendida entre aproximadamente 0,5 micromol de colorante/cm³ de soporte polimérico y aproximadamente 20 micromoles de colorante/cm³ de soporte polimérico. Preferentemente, la cantidad de colorante que está acoplada al soporte polimérico está comprendida entre aproximadamente 1 micromol de colorante/cm³ de soporte polimérico y aproximadamente 6 micromoles de colorante/cm³ de soporte polimérico. Más preferentemente, la cantidad de colorante que está acoplada al soporte polimérico está comprendida entre aproximadamente 2 micromoles de colorante/cm³ de soporte polimérico y aproximadamente 4 micromoles de colorante/cm³ de soporte polimérico.

[0032] En términos generales, el soporte polimérico es cualquier polímero capaz de ser utilizado como una matriz de afinidad en experimentos de inmunoprecipitación o de arrastre molecular basado en la afinidad, que incluye un sitio de acoplamiento para permitir el acoplamiento de un colorante. El polímero presenta preferentemente una baja capacidad de unión no específica a proteínas y una alta capacidad de unión tanto al colorante como a los ligandos de afinidad o ligandos de unión a proteínas con los que pueda estar modificado. Los polímeros pueden ser naturales o sintéticos. Los polímeros naturales o sintéticos pueden estar reticulados. Entre tales polímeros se incluyen, entre otros, agarosa naturales, agarosa, dextrano, dextrano reticulado, alginato de xilano, quitosano, celulosa en microesferas, poliacrilamida, poliacrilato, poliestireno, polimetacrilato, policaprolactonas, polioxietilenos, resinas de polivinilo, copolímeros de poliacrilamida-agarosa reticulados y copolímeros de dextrano-poliacrilamida. Las combinaciones de estos y otros polímeros también se incluyen dentro del alcance de la invención, siempre que estos polímeros combinados posean las características deseadas de baja capacidad de unión no específica a proteínas y alta capacidad de unión tanto a colorantes como a ligandos de afinidad. Los polímeros preferentes incluyen aquellos utilizados con frecuencia en los experimentos de arrastre molecular basado en la afinidad e inmunoprecipitación. Por lo tanto, agarosa natural, agarosa reticulada, poliacrilamida y dextrano reticulado son los polímeros preferentes para su uso en la invención. La agarosa reticulada es el polímero más preferente para su uso en la invención. El soporte polimérico puede adoptar cualquier forma apropiada para la aplicación de inmunoprecipitación o arrastre molecular basado en la afinidad para la que están destinados. El soporte polimérico puede ser soluble o insoluble en soluciones acuosas. Preferentemente, el soporte polimérico es insoluble en soluciones acuosas. Para la mayoría de las aplicaciones de inmunoprecipitación o arrastre molecular basado en la afinidad, los soportes poliméricos se presentarán en forma de partículas o microesferas. Por lo tanto, es preferente que el soporte polimérico se presente en forma de partículas o microesferas.

[0033] En general, la matriz de afinidad comprenderá un soporte polimérico en partículas en el cual las partículas tienen un tamaño medio de menos de aproximadamente 1000 micrómetros. Típicamente, las partículas en el soporte polimérico en partículas tendrán un tamaño medio de menos de aproximadamente 700 micrómetros, más típicamente de menos de 600 micrómetros. Por ejemplo, para algunas aplicaciones las partículas del soporte polimérico en partículas tendrán un tamaño medio inferior a aproximadamente 400 micrómetros y, en otras aplicaciones, las partículas tendrán un tamaño medio inferior a aproximadamente 200 micrómetros.

[0034] Las partículas de agarosa natural y reticulada suelen oscilar entre aproximadamente 20 y aproximadamente 300 micrómetros de diámetro. Preferentemente, las partículas de agarosa natural y reticulada varían entre aproximadamente 30 y aproximadamente 250 micrómetros de diámetro. Más preferentemente, las partículas de agarosa natural y reticulada varían entre aproximadamente 40 y aproximadamente 165 micrómetros de diámetro. Las partículas de poliacrilamida suelen oscilar entre aproximadamente 20 y aproximadamente 200 micrómetros de diámetro. Preferentemente, las partículas de poliacrilamida varían entre aproximadamente 30 y aproximadamente 150 micrómetros de diámetro. Más preferentemente, las partículas de poliacrilamida varían entre aproximadamente 40 y aproximadamente 105 micrómetros de diámetro. Las partículas de dextrano y dextrano reticulado suelen oscilar entre aproximadamente 15 y aproximadamente 600 micrómetros de diámetro. Preferentemente, las partículas de dextrano y dextrano reticulado varían entre aproximadamente 20 y aproximadamente 400 micrómetros de diámetro. Más preferentemente, las partículas de dextrano y dextrano reticulado varían entre aproximadamente 50 y aproximadamente 300 micrómetros de diámetro.

[0035] Por lo tanto, un ejemplo de un soporte polimérico coloreado adecuado para su uso en la invención serían las partículas de agarosa natural con un diámetro comprendido entre aproximadamente 30 y aproximadamente 250 micrómetros que poseen entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 20 micromoles de colorante por cm³ de agarosa natural. Otro ejemplo de un soporte polimérico coloreado adecuado para su uso en la invención serían las partículas de poliacrilamida con un diámetro comprendido entre aproximadamente 30 y aproximadamente 150 micrómetros y que poseen entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 20 micromoles de colorante por cm³ de poliacrilamida. Un ejemplo adicional de un soporte polimérico coloreado adecuado para su uso en la invención serían las partículas de dextrano reticulado con un diámetro comprendido entre aproximadamente 20 y aproximadamente 400 micrómetros y que poseen entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 20 micromoles de

colorante por cm^3 de dextrano reticulado.

- [0036]** Un soporte polimérico coloreado preferente para su uso en la invención son las partículas de agarosa reticulada con un diámetro comprendido entre aproximadamente 20 y aproximadamente 300 micrómetros que poseen entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 micromoles de colorante por cm^3 de agarosa reticulada. Otro soporte polimérico coloreado preferente para su uso en la invención son las partículas de agarosa reticulada con un diámetro comprendido entre aproximadamente 20 y aproximadamente 300 micrómetros que poseen entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 micromoles de colorante por cm^3 de agarosa reticulada.
- 10 **[0037]** Un soporte polimérico coloreado más preferente para su uso en la invención son las partículas de agarosa reticulada con un diámetro comprendido entre aproximadamente 30 y aproximadamente 250 micrómetros que poseen entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 micromoles de colorante por cm^3 de agarosa reticulada. Otro soporte polimérico coloreado más preferente para su uso en la invención son las partículas de agarosa reticulada con un diámetro comprendido entre aproximadamente 30 y aproximadamente 250 micrómetros que poseen entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 micromoles de colorante por cm^3 de agarosa reticulada.
- 15 **[0038]** Un soporte polimérico coloreado aún más preferente para su uso en la invención son las partículas de agarosa reticulada con un diámetro comprendido entre aproximadamente 40 y aproximadamente 165 micrómetros que poseen entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 micromoles de colorante por cm^3 de agarosa reticulada. Otro soporte polimérico coloreado aún más preferente para su uso en la invención son las partículas de agarosa reticulada con un diámetro comprendido entre aproximadamente 40 y aproximadamente 165 micrómetros que poseen entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 micromoles de colorante por cm^3 de agarosa reticulada. El colorante puede estar unido covalentemente al soporte polimérico por cualquier medio adecuado disponible para los expertos en la materia. La unión se produce preferentemente a través de grupos reactivos en el colorante y en los sitios de acoplamiento en el soporte polimérico. Los sitios de acoplamiento en el soporte polimérico incluyen, entre otros, grupos hidroxilo, grupos amina y grupos carboxilo. Es posible crear sitios de acoplamiento adicionales mediante la conversión de todos o algunos de los sitios de acoplamiento presentes de forma natural en el polímero a diferentes sitios de acoplamiento. Por ejemplo, los grupos hidroxilo se encuentran en un soporte polimérico dado se pueden convertir en grupos funcionales tales como aminas, grupos sulfhidrilo o ácidos carboxílicos. Del mismo modo, también es posible crear grupos reactivos adicionales en el colorante mediante la conversión de todos o algunos de los grupos reactivos presentes de forma natural en el colorante a diferentes grupos reactivos. El colorante se podría modificar de manera que contuviese un grupo amina, por ejemplo.
- 20 **[0039]** El colorante puede estar acoplado de forma covalente, por ejemplo, mediante la sustitución de átomo(s) de cloro en el anillo de triazina de algunos de los colorantes con los grupos hidroxilo en algunas de las matrices de polímero. Los colorantes también pueden estar unidos a través de los grupos sulfona de vinilo de ciertos de los colorantes y de los grupos hidroxilo de algunos de los polímeros. Preferentemente, el colorante está directamente unido de manera covalente al soporte polimérico. Sin embargo, también es posible, aunque no preferente, que el colorante esté indirectamente unido de manera covalente al soporte polimérico. Tal unión indirecta podría implicar el uso de un separador o de una molécula diferente para unir el colorante al soporte polimérico. Entre los separadores típicos se incluyen los separadores de hidrocarburos, tales como separadores de hexilo.
- 25 **[0040]** En una realización, los colorantes se unen a una resina de agarosa por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la agarosa se puede centrifugar, lavarse varias veces y suspenderse en bicarbonato de sodio. Seguidamente, el colorante se puede disolver en cloruro de sodio y la solución de sal/colorante se añade a la suspensión de carbonato de resina. A continuación, la combinación de la solución de colorante/sal y la suspensión de carbonato/resina se pueden incubar (p. ej., a temperaturas comprendidas entre 25 °C y 80 °C) durante un período de tiempo que oscila entre una hora y varias horas y luego centrifugarse o filtrarse para retirar el sobrenadante. El sedimento de agarosa coloreada se lava repetidamente con agua hasta que se retira el colorante no unido. La resina se resuspende en un tampón de almacenamiento adecuado.
- 30 **[0041]** Los colorantes también se pueden unir a la agarosa utilizando un procedimiento similar usando condiciones alcalinas a temperaturas comprendidas entre 25 °C y 80 °C durante un período que oscila entre una hora y varias horas. Las condiciones alcalinas se pueden proporcionar mediante la utilización de NaOH en el procedimiento. Después del acoplamiento, el polímero se lava repetidamente con agua para retirar el colorante no unido. Este procedimiento ha sido utilizado para unir ciertos colorantes Procion y Remazol a agarosa (Hasnaoui, M., y cols., J. Chromatogr. A, 766, 49-60, 1997). Se entiende que cuando se realice el acoplamiento de diferentes colorantes y otros polímeros, puede ser necesario realizar variaciones y ajustes apropiados en los procedimientos de acoplamiento, los cuales resultarán obvios para los expertos en la materia.

[0042] Una vez unido el colorante, el soporte polimérico coloreado posee preferentemente unas similares características de solubilidad y centrifugación, así como una densidad similar a las poseídas por el mismo polímero al que no se ha unido el colorante. Por ejemplo, si el polímero es insoluble en solución acuosa, el soporte polimérico coloreado también es preferentemente insoluble en solución acuosa. Preferentemente, el polímero coloreado se puede recoger fácilmente a partir de soluciones acuosas mediante centrifugación a menos de 700 x g.

[0043] Otra realización de la invención está dirigida a un procedimiento para el aislamiento de una biomolécula a partir de una solución de muestra acuosa utilizando la matriz de afinidad de la invención, caracterizándose la matriz de afinidad porque tiene una visibilidad mejorada y posee unas características de baja capacidad de unión no específica a proteínas. La matriz de afinidad utilizada en el procedimiento de aislamiento de una biomolécula de interés comprende una mezcla de un soporte polimérico coloreado y una matriz de afinidad no coloreada.

[0044] Entre los ejemplos de ligandos de afinidad usados con frecuencia se incluyen anticuerpos, quelatos metálicos, glutatión, estreptavidina, estreptavidina monomérica, moléculas con las propiedades de unión de estreptavidina tales como formas modificadas de estreptavidina, avidina, avidina monomérica, moléculas con las propiedades de unión de avidina, tales como formas modificadas de avidina, estreptactina, estreptactina monomérica, moléculas con las propiedades de unión de estreptactina, tales como formas modificadas de estreptactina, extravidina, extravidina monomérica, moléculas con las propiedades de unión de extravidina, tales como formas modificadas de extravidina, neutravidina, neutravidina monomérica, moléculas con las propiedades de unión de neutravidina, tales como formas modificadas de neutravidina, proteína A, una molécula con las propiedades de unión de la proteína A, tales como fragmentos, combinaciones, formas recombinantes u otras variantes de la proteína A, proteína L, una molécula con las propiedades de unión de la proteína L, tales como fragmentos, combinaciones, formas recombinantes u otras variantes de la proteína L, la proteína G, una molécula con las propiedades de unión de la proteína G, tales como fragmentos, combinaciones, formas recombinantes u otras variantes de la proteína G, la proteína A/G, una molécula con las propiedades de unión de la proteína A/G, tales como fragmentos, combinaciones, formas recombinantes u otras variantes de la proteína A/G, la proteína L/A, una molécula con las propiedades de unión de la proteína L/A, tales como fragmentos, combinaciones, formas recombinantes u otras variantes de la proteína L/A, calmodulina, una molécula con las propiedades de unión de calmodulina, biotina, y una molécula con las propiedades de unión de la biotina.

[0045] Al estar modificada con un ligando de afinidad, la matriz de afinidad resulta adecuada para su uso con todos los tipos de procedimientos de inmunoprecipitación o de arrastre molecular basado en la afinidad, puesto que la matriz de afinidad tiene similares características de centrifugación y solubilidad que una matriz de afinidad coloreada comparable y no funciona de manera diferente en términos de aislamiento, purificación y análisis de las biomoléculas de interés. Los procedimientos mediante los cuales el soporte polimérico coloreado se puede modificar con ligandos de afinidad son bien conocidos para los expertos en la materia.

[0046] No es necesario realizar ajustes particulares a los procedimientos de arrastre molecular basado en la afinidad estándar, dado que la matriz de afinidad de la invención tiene características de centrifugación y solubilidad similares a las de una matriz de afinidad no coloreada equivalente y no funciona de manera diferente en términos de aislamiento y purificación de las biomoléculas de interés. Sin embargo, los procedimientos para los experimentos de arrastre molecular basado en la afinidad (captura por afinidad) variarán, dependiendo de la naturaleza del ligando de afinidad fijado a la matriz y de su biomolécula diana. Una persona experta en la materia estará bien familiarizada con los diversos procedimientos para los experimentos de arrastre molecular basado en la afinidad. Los procedimientos de arrastre molecular basado en la afinidad incluyen las siguientes etapas básicas. La matriz de afinidad que poseen ligandos de afinidad acoplados se incubaba con una solución acuosa que contiene la biomolécula de interés. La naturaleza de la interacción de afinidad, incluidas la fuerza y duración de la interacción, puede variar ampliamente, dependiendo de los objetivos del experimento o procedimiento en particular. Por lo tanto, la interacción de afinidad entre el ligando de afinidad y la biomolécula de interés puede ser transitoria o con una duración suficiente como para que se forme un complejo específico entre el ligando de afinidad y la biomolécula de interés. En esos experimentos y procedimientos en los que se forma un complejo, la matriz de afinidad a la que está acoplado el complejo se separa de la solución acuosa por centrifugación. Seguidamente, las proteínas no unidas se retiran por aspiración del sobrenadante y lavado del complejo. Las partículas se pueden lavar mediante enjuague con una solución tal como tampón de lisis y retirada del lisado y del tampón de lavado por aspiración. Asimismo, se puede usar la filtración para separar el complejo de la solución acuosa. A continuación, la biomolécula de interés se puede extraer del complejo o se puede analizar su actividad mientras sigue formando parte del complejo que está acoplado a la matriz de afinidad. Si se ha extraído del complejo, la biomolécula se puede someter a análisis físicos, químicos o funcionales. Por ejemplo, el peso molecular de la biomolécula se podría determinar entonces por SDS/PAGE o se podría llevar a

cabo un ensayo enzimático en la biomolécula no unida.

[0047] La inmunoprecipitación es un tipo de procedimiento de arrastre molecular basado en la afinidad. El procedimiento básico de inmunoprecipitación implica la preparación de la solución de antígeno y la formación y purificación de los complejos antígeno-anticuerpo. Los complejos anticuerpo-antígeno se forman mediante la adición de anticuerpos específicos al lisado. La afinidad de los anticuerpos por sus respectivos antígenos hará que los complejos antígeno-anticuerpo se formen rápidamente. Seguidamente, se añade una suspensión de microesferas de afinidad, tal como una suspensión de microesferas de proteína A o proteína G, a la solución acuosa que contiene los complejos antígeno-anticuerpo con el fin de purificar los complejos. La alta afinidad que presentan la proteína A y la proteína G por la región Fc del anticuerpo facilita la purificación de los complejos. Una vez que el complejo se ha unido a las partículas del soporte polimérico a través de la interacción proteína A/G-anticuerpo, las partículas se separan de la solución acuosa por centrifugación. Seguidamente, las proteínas no unidas se retiran por aspiración del sobrenadante y lavado del complejo. Los lavados se retiran por aspiración. Asimismo, se puede usar la filtración para separar las partículas de la matriz de afinidad de la solución acuosa. A continuación, la biomolécula de interés se puede extraer del complejo o se puede analizar su actividad mientras sigue formando parte del complejo que está acoplado al soporte polimérico. El documento de Harlow, citado anteriormente, describe las condiciones adecuadas para los experimentos de inmunoprecipitación. No es necesario realizar ajustes particulares a los procedimientos de inmunoprecipitación estándar, dado que la matriz de afinidad coloreada tiene características de centrifugación y solubilidad similares a las de una matriz de afinidad no coloreada del mismo polímero y no funciona de manera diferente en términos de aislamiento y purificación de las biomoléculas de interés. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en el caso de las matrices de afinidad no coloreadas, la matriz de afinidad coloreada será visible durante las diversas manipulaciones del procedimiento de inmunoprecipitación.

[0048] Dado que no se realizan modificaciones en los procedimientos de arrastre molecular basado en la afinidad e inmunoprecipitación debido a la presencia de la matriz de afinidad coloreada, las siguientes etapas generales se siguen en ambos procedimientos. La primera etapa del procedimiento de arrastre molecular basado en la afinidad para purificar y aislar una biomolécula de interés implica la combinación de una solución acuosa que contiene la biomolécula de interés con una matriz de afinidad coloreada que tiene una visibilidad mejorada y características de baja capacidad de unión no específica a proteínas. La combinación se puede lograr mediante la adición de la matriz de afinidad coloreada a la solución acuosa que contiene la biomolécula. Preferentemente, la combinación se lleva a cabo mediante la adición de la solución acuosa que contiene la biomolécula a la matriz de afinidad coloreada.

[0049] La solución acuosa que contiene la biomolécula de interés es típicamente un lisado, fracciones de lisado o una solución tamponada que contiene proteínas u otras biomoléculas o biomoléculas modificadas en una forma purificada o no purificada, aunque se pueden utilizar otras soluciones acuosas que contengan biomoléculas. Las biomoléculas pueden ser de origen natural, de origen sintético, o biomoléculas de origen natural o sintéticas que han sido modificadas de alguna manera. Entre los ejemplos de biomoléculas de origen natural de interés se incluyen, entre otras, péptidos, polipéptidos, proteínas individuales, glucoproteínas, enzimas, nucleótidos, polinucleótidos, polímeros de ácidos nucleicos tales como ADN o ARN, carbohidratos, lípidos o complejos que contienen proteínas. Entre los ejemplos de biomoléculas sintéticas se incluyen, entre otras, péptidos sintéticos, polipéptidos sintéticos, proteínas sintéticas, glucoproteínas individuales sintéticas, nucleótidos sintéticos, polinucleótidos sintéticos, polímeros sintéticos de ácidos nucleicos tales como ADN o ARN, enzimas sintéticas, carbohidratos sintéticos, lípidos sintéticos o complejos sintéticos que contienen proteínas. Entre los ejemplos de biomoléculas modificadas se incluyen, entre otras, biomoléculas de origen natural o sintéticas que han sido modificadas mediante procedimientos tales como escisión enzimática o provistas de marcadores sintéticos tales como marcadores de biotilación o de epítipo de aminoácido. La solución también puede contener mezclas de estas biomoléculas.

[0050] La segunda etapa del procedimiento consiste en separar la matriz de afinidad coloreada de la solución acuosa. La matriz de afinidad coloreada se separa normalmente de la solución acuosa por centrifugación y aspiración del sobrenadante. Sin embargo, se podría aplicar filtración u otro procedimiento adecuado para separar la matriz de la solución acuosa, dependiendo del experimento en particular. La centrifugación se realiza típicamente a 8000 x g durante 30 segundos o menos. Sin embargo, puede haber una variación considerable en los procedimientos de centrifugación adecuados para los experimentos de inmunoprecipitación y arrastre molecular basado en la afinidad. Por lo tanto, se podría aplicar una velocidad más lenta de centrifugación durante un período más largo. Del mismo modo, se podría aplicar una centrifugación a mayor velocidad durante un período más corto, dependiendo del tipo de experimento de inmunoprecipitación y arrastre molecular basado en la afinidad y de las preferencias del operador.

[0051] Las biomoléculas no unidas se pueden retirar de la matriz de afinidad coloreada por lavado de la matriz de

afinidad coloreada. Los lavados se retiran por aspiración. Debido a su detectabilidad óptica, la matriz de afinidad coloreada se puede monitorizar ópticamente durante el procedimiento de lavado y de aspiración. Preferentemente, la monitorización óptica se lleva a cabo mediante visualización por parte del operador en luz ambiente. Sin embargo, la monitorización óptica también se podría realizar mediante una máquina o dispositivo, e incluso podría ser automatizada. Por lo tanto, el operador es capaz de confirmar visualmente la localización de la matriz de afinidad coloreada durante el procedimiento de lavado y es menos probable que se retiren accidentalmente las partículas de la matriz de afinidad coloreada por aspiración. Esta capacidad de monitorizar ópticamente la matriz aumentará la fiabilidad y reducirá la variabilidad cuantitativa del procedimiento.

- 10 **[0052]** Dependiendo de los objetivos del experimento, un experimento satisfactorio puede lograr que la biomolécula de interés se una a la matriz de afinidad coloreada a través de interacciones de afinidad. Un etapa adicional del procedimiento de purificación y aislamiento de una biomolécula de interés consistiría en liberar o tratar las biomoléculas unidas con el fin de permitir posteriores análisis físicos, químicos o funcionales. Entre los ejemplos de análisis físicos se incluyen la determinación del peso molecular por SDS/PAGE. El análisis bioquímico podría incluir la identificación de modificaciones postraduccionales, y el análisis funcional podría incluir un ensayo enzimático, por ejemplo.

- 20 **[0053]** La matriz de afinidad coloreada utilizada en el procedimiento de purificación y aislamiento de una biomolécula de interés por arrastre molecular basado en la afinidad comprende una mezcla de un soporte polimérico coloreado de la invención y una matriz de afinidad o coloreada. Esta mezcla se prepara combinando el soporte polimérico coloreado con una matriz de afinidad no coloreada.

- 25 **[0054]** Las propiedades de densidad, solubilidad y la centrifugación de soporte polimérico coloreado y la matriz de afinidad no coloreada deben ser tales que la matriz de afinidad coloreada muestre una detectabilidad óptica mejorada con respecto a las matrices de afinidad no coloreadas convencionales. Preferentemente, el soporte polimérico coloreado de la invención tiene propiedades de centrifugación y solubilidad sustancialmente similares y la misma densidad aproximada que la matriz de afinidad no coloreada con la que está siendo combinado. Cuando tienen propiedades y densidad similares, el soporte polimérico coloreado tenderá a distribuirse de manera sustancialmente uniforme en la matriz de afinidad no coloreada para proporcionar un color uniforme, que en una realización se puede visualizar en luz ambiente por un operador o bien ópticamente mediante un dispositivo de detección óptica. Por distribución uniforme se entiende que el soporte polimérico coloreado se distribuye uniformemente dentro de la matriz de afinidad no coloreada después de la mezcla, de manera que el aspecto de la matriz de afinidad coloreada tenga un color regular y uniforme sin concentración de color en ningún área particular de la matriz. Esta distribución del soporte polimérico coloreado dentro de la matriz de afinidad no coloreada se mantiene uniforme después de la centrifugación. Además, el soporte polimérico coloreado no altera ni afecta en modo alguno al funcionamiento de la matriz de afinidad no coloreada para aislar y purificar moléculas de interés.

- 40 **[0055]** En general, se prefiere que el soporte polimérico coloreado y el soporte polimérico no coloreado se puedan preparar a partir del mismo tipo y tamaño de polímero. Siempre que sean suficientemente similares en términos de características de centrifugación, solubilidad y densidad, los soportes poliméricos coloreados y no coloreados pueden comprender diferentes tipos de polímeros o tamaños de partículas. Del mismo modo, el soporte polimérico coloreado y el soporte polimérico no coloreado pueden comprender cada uno o más tipos o tamaños de soportes poliméricos.

- 45 **[0056]** La matriz de afinidad puede comprender cualquiera de una amplia variedad de ligandos de afinidad en la superficie de cualquiera de una amplia variedad de soportes poliméricos. Por ejemplo, el ligando de afinidad puede ser cualquier elemento de un par de unión de moléculas (siendo cada uno un elemento de un par de unión específico) que se deriva de manera natural o se produce sintéticamente. Uno de los pares de moléculas tiene un área en su superficie, o una cavidad, que se une específicamente, y por lo tanto se define como complementaria, a una organización espacial y polar particular de la otra molécula, de manera que el par tiene la propiedad de unirse específicamente entre sí. Como ejemplos de tipos de pares de unión específica se pueden citar antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato e IgG-proteína A.

- 55 **[0057]** En una realización de la presente invención, el soporte polimérico comprende agarosa y tiene unido a la superficie de la agarosa la proteína A («proteína A agarosa») o un derivado o análogo de la misma que tenga unas propiedades de unión comparables a la proteína A agarosa, la proteína G («proteína G agarosa») o un derivado o análogo de la misma que tenga unas propiedades de unión comparables a la proteína G agarosa, la proteína L («proteína L agarosa») o un derivado o análogo de la misma que tenga unas propiedades comparables unión a la proteína L agarosa, y combinaciones de los mismos tales como proteína A/G agarosa o agarosa modificada con una

molécula con las propiedades de unión de la proteína A/G, y proteína L/A agarosa o agarosa modificada con una molécula con las propiedades de unión de la proteína L/A.

[0058] En otra realización, se encuentra unido al soporte polimérico un anticuerpo que es específico para un marcador peptídico de una proteína de fusión, o para un epítipo situado dentro de una proteína que puede ser compartido entre una serie de proteínas. Entre los ejemplos de anticuerpos que se pueden unir a matrices se incluyen, entre otros, anticuerpos que tienen especificidad por al menos una parte de la secuencia de aminoácidos DYKDDDDK (p. ej., anticuerpos anti-FLAG™ comercializados por Sigma-Aldrich), antipolihistidina, anti-glutación-S-transferasa, anti-Myc-tag, anti-Avi-tag, anti-HA, anti-proteína verde fluorescente, anti-beta galactosidasa, anti-tiorredoxina, anti-proteína de unión a maltosa, anti-dominio de unión a celulosa, anti-glucoproteína del VSV, y anti-luciferasa.

[0059] En otra realización, el ligando de afinidad unido al soporte polimérico es distinto de un elemento de un par de anticuerpos. Por ejemplo, dichos ligandos de afinidad incluyen estreptavidina, estreptavidina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de estreptavidina, avidina, avidina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de avidina, estreptactina, estreptactina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de estreptactina, extravidina, extravidina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de extravidina, neutravidina, neutravidina monomérica, y una molécula con las propiedades de unión de neutravidina, calmodulina, una molécula con las propiedades de unión de calmodulina, biotina, una molécula con las propiedades de unión de biotina, glutatión, y quelatos metálicos.

[0060] El soporte polimérico coloreado se puede combinar con la matriz de afinidad no coloreada por cualquier procedimiento adecuado. El soporte polimérico coloreado se puede combinar con la matriz de afinidad no coloreada, por ejemplo, mediante pipeteo de cada matriz en forma de suspensiones. Por lo tanto, si se desea preparar una matriz de afinidad coloreada que contenga un 10 % del soporte polimérico coloreado, se podría pipetear una cantidad equivalente a 9 partes de matriz de afinidad no coloreada en un tubo como una suspensión al 50 % y luego se podría pipetear una cantidad de un equivalente a 1 parte de soporte polimérico coloreado en el mismo tubo como una suspensión al 50 %. A continuación, las suspensiones se podrían mezclar con el fin de lograr una suspensión uniforme. Las partes se podrían medir por volumen o por peso.

[0061] Las suspensiones también se podrían filtrar, pesar y después mezclar manualmente para proporcionar una matriz de afinidad coloreada. Por lo tanto, si se desea preparar una matriz de afinidad coloreada que contenga el 10 % del soporte polimérico coloreado, se podría usar el siguiente procedimiento. Se podría filtrar por separado una suspensión de matriz de afinidad no coloreada y una suspensión soporte polimérico color con ayuda de papel de filtro. Se podría pesar una cantidad del soporte polimérico coloreado equivalente a 1 parte en peso y combinarla con una cantidad equivalente a 9 partes en peso de la matriz de afinidad no coloreada obtenida de la misma manera. Seguidamente, se podría resuspender la combinación del soporte polimérico coloreado y la matriz de afinidad no coloreada en un tampón adecuado y mezclar manualmente la suspensión resultante para proporcionar una matriz de afinidad coloreada. La selección y la puesta en práctica de un procedimiento apropiado caen dentro de la experiencia de un experto en la materia.

[0062] La cantidad de soporte polimérico coloreado en la matriz de afinidad coloreada puede variar considerablemente y se selecciona de acuerdo con los siguientes tres criterios básicos. La matriz de afinidad coloreada es ópticamente detectable, y muestra una capacidad de unión no específica a proteínas comparable a la de la matriz de afinidad no coloreada. Además, la matriz de afinidad coloreada muestra una capacidad de unión específica a biomoléculas comparable a la de una matriz de afinidad no coloreada. Ópticamente detectable significa que la matriz de afinidad debe ser capaz de ser detectada ópticamente, ya sea por una máquina o por visualización de un operador u observador. La matriz de afinidad coloreada debe ser capaz de ser detectada ópticamente durante las diversas manipulaciones del procedimiento. Se entiende por capacidad de unión no específica a proteínas comparable que la matriz de afinidad coloreada no mostrará una capacidad de unión no específica a proteínas significativamente mayor en comparación con la matriz de afinidad no coloreada. Una capacidad de unión no específica a proteínas significativamente mayor sería una cantidad que pudiera interferir con el posterior análisis de la biomolécula diana. Esta cantidad puede variar dependiendo de la aplicación específica elegida por el operador. Capacidad de unión específica a biomoléculas comparable significa que la matriz de afinidad coloreada tendrá similar afinidad y capacidad de unión a la biomolécula de interés en el inmunoensayo o procedimiento de arrastre molecular en comparación con las de una matriz de afinidad no coloreada, y se unirá a una cantidad similar de esta biomolécula como lo haría una matriz de afinidad no coloreada.

[0063] Por lo tanto, la cantidad de soporte polimérico coloreado en la matriz de afinidad coloreada utilizada en el

experimento particular de arrastre molecular o inmunoprecipitación puede variar entre aproximadamente el 1 % en volumen y aproximadamente el 95 % en volumen. Preferentemente, la cantidad de soporte polimérico coloreado en la matriz de afinidad coloreada varía entre aproximadamente el 2 % en volumen y aproximadamente el 50 % en volumen. Más preferentemente, la cantidad de soporte polimérico coloreado en la matriz de afinidad coloreada varía entre aproximadamente el 2 % en volumen y aproximadamente el 10 % en volumen. Sin embargo, existen muchas variables involucradas en la determinación de la cantidad apropiada de soporte polimérico coloreado que se añade a la matriz de afinidad no coloreada, algo que resultará conocido para un experto en la materia. Una de estas variables es el tipo de colorante utilizado en el soporte polimérico coloreado y la intensidad de su color en la luz ambiente. Así, un colorante amarillo como Remazol GL Amarillo no tendría tan intenso color como Remazol rojo brillante BB, y un mayor porcentaje de polímero coloreado Remazol GL Amarillo ser requerida puede lograr una visibilidad adecuada en luz ambiente. Otra variable incluye el tipo de técnica de arrastre molecular; el funcionamiento de determinados ligandos de afinidad podría ser más sensible a la presencia de moléculas de colorante en el soporte polimérico y se podría utilizar un menor porcentaje de soporte polimérico coloreado sin que ello afectase a la afinidad de la matriz de afinidad coloreada por la biomolécula de interés ni a la unión de la biomolécula de interés.

[0064] La matriz de afinidad coloreada de la invención también resulta útil como medio de identificación de un experimento de arrastre molecular o inmunoprecipitación particular; es posible distinguir dos experimento de arrastre molecular o inmunoprecipitación diferentes por el color de la matriz de afinidad que se utilice en el experimento. Por consiguiente, la matriz de afinidad coloreada también puede servir de ayuda al operador encargado de múltiples experimentos. Por otra parte, el uso de una matriz de afinidad coloreada del tipo descrito en este documento en un experimento de arrastre molecular basado en la afinidad o inmunoprecipitación ofrece la capacidad de visualizar y monitorizar la localización de la matriz de afinidad durante el procedimiento. Esta capacidad de visualizar y monitorizar la localización de la matriz de afinidad durante el procedimiento permitirá que las diversas manipulaciones involucradas en los experimento de arrastre molecular basado en la afinidad o inmunoprecipitación resulten mucho más fáciles para el operador y contribuirá a reducir los errores del operador. Esta mejora de las técnicas de arrastre molecular basado en la afinidad e inmunoprecipitación existentes puede mejorar enormemente la fiabilidad de estas potentes técnicas. Los siguientes ejemplos tienen como propósito ilustrar la invención, aunque no en sentido limitativo.

30 **EJEMPLO 1**

Comparación de la compatibilidad de diferentes matrices coloreadas y no coloreadas

[0065] Se compararon diferentes matrices coloreadas y no coloreadas mediante un procedimiento de mezcla, seguido de centrifugación y observación visual del sedimento de matriz resultante.

[0066] Se procedió a hinchar agarosa Sepharose CL-4B (no coloreada) y Reactive Red 120 agarosa (n.º de producto Sigma R9129; rojo) y lavar mediante procedimientos estándar para equilibrarlas, tras lo cual se almacenaron en forma de suspensiones al 50 % de gel en solución salina con tampón Tris (TBS) con un 20 % de etanol. La Reactive Red 120 agarosa se añadió a la agarosa no coloreada en concentraciones del 0 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 100 %, se mezcló en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml estándar, y se centrifugó durante 30 segundos en una microcentrífuga estándar a 8.000 x g.

[0067] Se observaron cuidadosamente los sedimentos resultantes visualmente en luz ambiente con el fin de evaluar la uniformidad de la distribución del color en los sedimentos de matriz, así como la intensidad general del color. Todos los sedimentos mostraron un color uniforme, que estaba distribuido uniformemente por todo el sedimento de matriz, lo que indica que las propiedades de densidad y centrifugación de la Reactive Red 120 agarosa eran comparables a las de la agarosa no coloreada. La intensidad visual de los sedimentos que contenían Reactive Red agarosa varió desde el rojo oscuro para el 100 % de Reactive Red 120 agarosa hasta la roja claro/rosa para la mezcla del 5 % y fueron más visibles que la agarosa no coloreada sola. La mezcla de Reactive Red 120 agarosa al 10 % era fácilmente visible y mostraba la visibilidad deseada con una dilución mínima de la matriz de agarosa no coloreada (que imita un conjugado real de agarosa de captura por afinidad).

[0068] Este experimento demostró que una agarosa coloreada mezclada con agarosa no coloreada tenía las propiedades de centrifugación deseadas, dando lugar a unos sedimentos de soporte polimérico fácilmente visibles y de color uniforme después de la centrifugación.

EJEMPLO 2

Bloqueo con proteínas y reticulación

[0069] Realizamos un experimento para analizar si saturar las microesferas de matriz con una preparación de proteínas conocida y reticular esa proteína sobre las microesferas de agarosa protegería los sitios de unión a proteínas del colorante y, por tanto, disminuiría la cantidad de proteínas de lisado no específicas que podrían unirse a la matriz de agarosa coloreada.

[0070] Se añadieron 2,4 ml (1,2 ml de gel de relleno) de una suspensión de resina de afinidad al 50 % de Reactive Red 120 agarosa (n.º de producto Sigma R0503) a cada uno de seis tubos y se centrifugaron en una centrífuga de sobremesa a 2500 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se aspiraron cuidadosamente. Los sedimentos de resina se lavaron por adición de 9 ml de agua a cada tubo, mezclando y centrifugando según se describió anteriormente. Se aspiraron los sobrenadantes del lavado. Los sedimentos se lavaron dos veces más siguiendo el mismo procedimiento. Se añadieron a los sedimentos varias soluciones de proteínas de prueba, según se indica a continuación:

15 Tubo A - 4 ml de solución de albúmina a 5 mg/ml en agua
 Tubo B - 4 ml de solución de albúmina a 20 mg/ml en NaCl 4 M
 Tubo C - 4 ml de gelatina a 20 mg/ml en agua
 Tubo D - 4 ml de hidrolizado de caseína a 20 mg/ml en agua
 20 Tubo E - 4 ml de hidrolizado de gelatina a 40 mg/ml en agua
 Tubo F - 4 ml de mezcla de proteínas (1 ml de solución de albúmina a 5 mg/ml, 1 ml de gelatina a 20 mg/ml, 1 ml de hidrolizado de caseína a 20 mg/ml, 1 ml de hidrolizado de gelatina a 40 mg/ml)

[0071] Los tubos se mezclaron y se incubaron a 4 °C con mezcla rotacional suave durante 1 hora. A continuación, los tubos se centrifugaron como anteriormente para recoger los sedimentos de resina. Los sobrenadantes se retiraron por aspiración y los sedimentos se lavaron 3 veces como anteriormente con 9 ml de agua por lavado. Después de la aspiración de los sobrenadantes del lavado final, los sedimentos se llevaron cada uno a una suspensión al 50 % (volumen total por tubo de 2,4 ml) mediante la adición de 1,2 ml de agua a cada uno. Tras la mezcla, se tomaron 0,2 ml de cada para su posterior análisis.

30 **[0072]** Seguidamente, se llevó a cabo una reticulación en EDAC 0,1 M (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; n.º de producto Sigma E1769) para fijar las proteínas de bloqueo absorbida sobre las resinas. El pH de cada tubo de resina se ajustó a aproximadamente pH entre 5,4 y 5,7 con pequeñas gotas de HCl 0,1 M. A cada tubo de resina suspendida (2,2 ml por tubo) se añadieron 89,8 µl de una solución madre recién preparada de EDAC a 0,47 µg/ml en agua. Los tubos se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente con mezcla rotacional suave. El pH se reajustó a entre aproximadamente 5,0 y 5,7 cada 30 minutos durante las primeras dos horas de la reacción. Seguidamente, se dejó que la reacción continuase durante la noche (entre aproximadamente 16 y 18 horas). Para detener las reacciones, se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos a 2.500 x g. Después de aspirar los sobrenadantes, los sedimentos se lavaron tres veces como anteriormente con 8 ml de agua por lavado. Tras la aspiración de los sobrenadantes del lavado final, los sedimentos se suspendieron en forma de una suspensión al 50 % mediante la adición a cada uno de 1 ml de solución salina con tampón Tris con un 20 % de etanol y las suspensiones se pusieron a 4 °C para su almacenamiento. Se analizaron directamente 100 µl de cada suspensión de resina al 50 % (50 µl de gel de relleno) para evaluar la magnitud de la unión no específica a proteínas de fondo con lisados de células cultivadas de tejidos de mamíferos, según se describe en el siguiente protocolo de inmunoprecipitación simulada:

Protocolo inmunoprecipitación simulada

50 **[0073]**
 1. Preparar mezclas de microesferas de agarosa en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml para lograr 50 µl de gel de relleno por tubo de mezcla al 10 % de agarosa teñida con agarosa no coloreada: añadir 10 µl de suspensión al 50 % de agarosa teñida a 90 µl de suspensión al 50 % de agarosa no coloreada, agitar en un mezclador vortical y dejar en hielo.
 50 2. Lavar/equilibrar las microesferas de agarosa en tampón de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % DOC, 0,1 % SDS): añadir 750 µl de tampón RIPA a cada tubo, agitar en un mezclador vortical y centrifugar en microcentrífuga durante 30 segundos a 8.000 x g. Aspirar los sobrenadantes cuidadosamente (o retirar con una micropipeta) y dejar los tubos con los sedimentos de microesferas en hielo. Repetir el lavado como anteriormente. Dejar los sedimentos finales en hielo.

3. Descongelar los lisados celulares (1 ml de lisado RIPA de una estirpe celular de cultivo de tejidos recién confluente a partir de una placa de cultivo de tejidos de 100 mm) y dejarlos en hielo. Retirar el agregado de ADN desnaturalizado con una pipeta, si se hubiese formado. Transferir cada lisado a un tubo de microcentrífuga y centrifugar en microcentrífuga en cámara fría (4 °C) a 8.000 x g durante 10 minutos para sedimentar los desechos celulares y las proteínas desnaturalizadas insolubles. Retirar y combinar los sobrenadantes transparentes en un tubo colocado en hielo.
4. Mezclar el lisado combinado y añadir 1 ml a cada tubo de microesferas de agarosa lavadas colocado en hielo. Agitar brevemente en un mezclador vortical e incubar en cámara fría, mezclando lentamente en una rueda giratoria, durante 1 hora.
- 10 5. Centrifugar en una microcentrífuga durante 30 segundos a 8.000 x g. Aspirar los sobrenadantes cuidadosamente (o retirar con una micropipeta) y dejar los tubos con los sedimentos de microesferas en hielo.
6. Lavar los sedimentos de microesfera mediante la adición de 750 µl de tampón RIPA a cada tubo. Agitar brevemente en un mezclador vortical e incubar en cámara fría, mezclando lentamente en una rueda giratoria, durante 5 minutos. Centrifugar en microcentrífuga en cámara fría (4 °C) durante 30 segundos a 8.000 x g. Aspirar los sobrenadantes cuidadosamente (o retirar con una micropipeta) y dejar los tubos con los sedimentos de microesferas en hielo.
- 15 7. Repetir los lavados dos veces más, como en el etapa 6.
8. Añadir 25 µl de tampón RIPA a cada tubo, agitar brevemente en un mezclador vortical y, a continuación, añadir 25 µl de tampón de muestra de gel de proteína Laemmli 2X. Agitar brevemente en un mezclador vortical. Si no se tiene previsto utilizarlas de inmediato, congelar las muestras para su almacenamiento.
- 20 9. Hervir las muestras durante 5 minutos y centrifugar 30 segundos a 8.000 x g en una microcentrífuga para sedimentar la agarosa. Analizar 10 µl de cada sobrenadante y patrones de peso molecular en un gel de SDS/PAGE desnaturalizante.
10. Tefñir con colorante azul y/o plata coloidal para visualizar las bandas de proteínas. Fotografíar o escanear una imagen con fines de documentación y/o cuantificación.
- 25

Resultados:

- 30 **[0074]** Resina del tubo A (bloqueada con albúmina) - La albúmina se unió y reticuló con la resina de Reactive Red 120 agarosa; se redujo la unión no específica a proteínas de lisado en un 70-80 %.
- [0075]** Resina del tubo B (bloqueada con albúmina en NaCl 4 M) - La albúmina no se unió a la resina de Reactive Red 120 agarosa; no se redujo la unión no específica a proteínas de lisado.
- 35 **[0076]** Resina del tubo C (bloqueada con gelatina) - La gelatina se unió bien y reticuló bien con la resina de Reactive Red 120 agarosa; se redujo la unión no específica a proteínas de lisado en un 90-98 %.
- [0077]** Resina del tubo D (bloqueada con hidrolizado de caseína) - El hidrolizado de caseína no se unió a la resina de Reactive Red 120 agarosa; no se redujo la unión no específica a proteínas de lisado.
- 40 **[0078]** Resina del tubo E (bloqueada con hidrolizado de gelatina) - El hidrolizado de gelatina no se unió a la resina de Reactive Red 120 agarosa; no se redujo la unión no específica a proteínas de lisado.
- [0079]** Resina del tubo F (bloqueada con una mezcla de albúmina, gelatina, hidrolizado de caseína, hidrolizado de gelatina) - La mezcla se unió y reticuló parcialmente con la resina de Reactive Red 120 agarosa; se redujo la unión no específica a proteínas de lisado en un 80-90 %.
- 45 **[0080]** Las condiciones utilizadas para la resina del tubo C (bloqueada con gelatina) dieron lugar a un rendimiento óptimo para obtener una menor unión no específica a proteínas de lisado utilizando esta estrategia y se podrían asumir razonablemente que su comportamiento resultaría adecuado en inmunoprecipitación y otras aplicaciones de arrastre molecular.
- 50

EJEMPLO 3

- 55 Unión no específica a proteínas de conjugados de resina de agarosa con diversos colorantes

[0081] Se seleccionaron diversos colorantes a partir de referencias en la bibliografía científica en las que se evaluaba la capacidad de unión de proteínas de colorantes potencialmente útiles para la producción de resinas de cromatografía de afinidad. Se encontró que una serie de colorantes eran inadecuados para esa aplicación, debido a

su escasa capacidad de unirse a las proteínas. Preparamos conjugados de resina de agarosa con algunos de estos colorantes y analizamos su capacidad de unión no específica a proteínas.

[0082] Proción Red MX-B5 (n.º de producto Aldrich 404365) y Remazol Brilliant Orange R (n.º de producto Aldrich 306509) fueron algunos de los colorantes que, según la bibliografía, presentaban una escasa capacidad de unión a proteínas de lisado (Scopes, R.K., J. Chromatogr., 376, 131-140, 1986) y una escasa capacidad de unión a proteínas de IgG (Hasnaoui, M., y cols., J. Chromatogr. A, 766, 49-60, 1997). La tinción de agarosa con estos colorantes se llevó a cabo por el procedimiento de inmovilización de colorantes descrito en el documento de Hasnaoui, M., y cols., J. Chromatogr. A, 766, 49-60, 1997.

10

[0083] En cada reacción de inmovilización, se centrifugaron 2 ml de una suspensión al 50 % de agarosa Sepharose CL-4B (1 ml de gel de relleno) en una centrífuga de sobremesa durante 5 minutos a 2.500 x g a temperatura ambiente, y el sobrenadante se retiró por aspiración. Cada uno de los sedimentos de resina de agarosa se lavó tres veces con 10 ml de agua. En cada lavado, los tubos se mezclaron después de añadir el agua, se

15

[0084] Los sedimentos de resina de agarosa lavados se equilibraron lavando tres veces en 10 ml de solución de inmovilización (NaOH 200 mM con un 2 % de NaCl). En cada lavado, los tubos se mezclaron después de añadir la solución de inmovilización, se centrifugaron como anteriormente durante 2,5 minutos y los sobrenadantes se retiraron cuidadosamente por aspiración.

20

[0085] Se añadieron al sedimento de agarosa equilibrada 21 mg de colorante Proción Red MX-B5 o Remazol Brilliant Orange 3R en 2 ml de solución de inmovilización, se mezcló y se incubó en un baño de agua a 60 °C con mezcla constante por rotación suavemente durante 1 hora.

25

[0086] La reacción se detuvo y el colorante no unido se retiró mediante lavado secuencial con 10 ml de agua por lavado como antes hasta que los sobrenadantes del lavado fueron completamente transparentes e incoloros. A continuación, se retiró el sobrenadante del lavado final, los sedimentos de agarosa coloreados se suspendieron en 1 ml de solución salina con tampón Tris con un 20 % de etanol para dar una suspensión al 50 %, que se almacenó a 4 °C hasta su uso.

30

[0087] Se analizaron directamente, o mezclados al 10 % con agarosa no coloreada), 100 µl de cada suspensión de resina al 50 % (50 µl de gel de relleno) para evaluar la magnitud de la unión no específica a proteínas de fondo con lisados de células cultivadas de tejidos de mamíferos, según se describe en el protocolo de inmunoprecipitación simulada del ejemplo 2.

35

Resultados:

[0088] La Proción Red MX-5B agarosa al 100 % mostró que la unión no específica a proteínas de fondo se redujo en un 70-80 % en comparación con el control de Reactive Red 120 agarosa y fue comparable a la Reactive Red 120 agarosa bloqueada con gelatina y reticulada con EDAC (véase el ejemplo 2). La Remazol Brilliant Orange 3R agarosa al 100 % mostró que la unión no específica a proteínas de fondo se redujo en >95 % en comparación con el control de Reactive Red 120 agarosa. Al utilizarla como una mezcla al 10 % en agarosa, la Remazol Brilliant Orange 3R agarosa seguía siendo muy visible, pero no mostró ninguna diferencia significativa en términos de unión no específica a proteínas de fondo y era comparable a la agarosa no coloreada sola (100 % Sepharose CL-4B).

40

45

[0089] El procedimiento anterior demostró que somos capaces de preparar una resina de agarosa visible con las propiedades deseadas en términos de visibilidad, centrifugación y muy baja capacidad de unión a proteínas, que son necesarias para esta invención.

50

EJEMPLO 4

Acoplamiento de colorantes reactivos a agarosa usando carbonato

55

[0090] Otro procedimiento de acoplamiento de los colorantes a la agarosa implica la realización de una reacción de acoplamiento en un carbonato. En cada reacción de acoplamiento, se añadieron a un tubo 3,5 ml de una suspensión al 50 % de agarosa Sepharose CL-4B (1,75 ml de gel de relleno) y se centrifugó en una centrífuga de sobremesa durante 5 minutos a 2.500 x g a temperatura ambiente. Cada sobrenadante se retiró por aspiración.

Cada uno de los sedimentos de resina de agarosa se lavó tres veces con 10 ml de agua, como se describe en el ejemplo 2, y los sobrenadantes del lavado final se retiraron por aspiración. Cada uno de los sedimentos de resina de agarosa se suspendió en 0,5 volúmenes de gel de relleno (0,85 ml) de carbonato de sodio 0,4 M (Na_2CO_3).

- 5 **[0091]** Se pesaron cantidades de Proción Red MX-B5 (n.º de producto Aldrich 404365) y Remazol Brilliant Orange R (n.º de producto Aldrich 306509) para dar 20 mg/ml de gel de relleno (35 mg cada una) y cada uno se disolvió en 0,5 volúmenes de gel de relleno (0,85 ml) de NaCl 0,68 M. En cada reacción de acoplamiento, se añadió cada solución de colorante/sal (0,85 ml) a un tubo que contenía la suspensión de agarosa/carbonato (0,85 ml) preparada anteriormente. Cada tubo de reacción de acoplamiento se incubó a 60 °C en un baño de agua con agitación suave
10 para lograr una mezcla completa y continua.

- [0092]** Cada reacción se detuvo y el colorante no unido se retiró mediante centrifugación, aspiración y lavado secuencial de los sedimentos de agarosa con 10 ml de agua por lavado como antes hasta que los sobrenadantes del lavado fueron completamente transparentes e incoloros. A continuación, se retiró el sobrenadante del lavado
15 final, los sedimentos de agarosa coloreados se suspendieron en 1 ml de solución salina con tampón Tris con un 20 % de etanol para dar una suspensión al 50 %, que se almacenó a 4 °C hasta su uso.

- [0093]** Se analizaron directamente, o mezclados al 10 % con agarosa no coloreada), 100 µl de cada suspensión de resina al 50 % (50 µl de gel de relleno) para evaluar la magnitud de la unión no específica a proteínas de fondo
20 con lisados de células cultivadas de tejidos de mamíferos, según se describe en el protocolo de inmunoprecipitación simulada del ejemplo 2.

Resultados:

- 25 **[0094]** Los resultados fueron muy similares a los del ejemplo 3. La Proción Red MX-5B agarosa al 100 % mostró que la unión no específica a proteínas de fondo se redujo en un 70-80 % en comparación con el control de Reactive Red 120 agarosa y fue comparable a la Reactive Red 120 agarosa bloqueada con gelatina y reticulada con EDAC (véase el ejemplo 2). La Remazol Brilliant Orange 3R agarosa al 100 % mostró que la unión no específica a
30 proteínas de fondo se redujo en >95 % en comparación con el control de Reactive Red 120 agarosa. Al utilizarla como una mezcla al 10 % en agarosa, la Remazol Brilliant Orange 3R agarosa seguía siendo muy visible, pero no mostró una unión no específica a proteínas de fondo detectable y era comparable a la agarosa no coloreada sola (100 % Sepharose CL-4B).

- [0095]** Este procedimiento permite la preparación de una resina de agarosa visible con las propiedades deseadas
35 en términos de visibilidad, centrifugación y muy baja capacidad de unión a proteínas, que son necesarias para esta invención, sin necesidad de soluciones alcalinas.

EJEMPLO 5

- 40 Uso de una matriz de afinidad coloreada en un procedimiento de inmunoprecipitación

- [0096]** Remazol Brilliant Red BB se acopló a agarosa (Sepharose CL-4B) utilizando el procedimiento descrito en el ejemplo 4. Se analizó la resina de color resultante, Brilliant Red BB agarosa, para evaluar la magnitud de la unión no
45 específica a proteínas de fondo con lisados de células cultivadas de tejidos de mamíferos, según se describe en el protocolo de inmunoprecipitación simulada del ejemplo 2. La Remazol Brilliant Red BB agarosa al 100 % mostró que la unión no específica a proteínas de fondo se redujo en >95 % en comparación con el control de Reactive Red 120 agarosa. Al utilizarla como una mezcla al 10 % en agarosa, la Remazol Brilliant Red BB agarosa seguía siendo muy visible, pero no mostró una unión no específica a proteínas de fondo significativa y era comparable a la agarosa no coloreada sola (100 % Sepharose CL-4B).

- 50 **[0097]** En el siguiente experimento de inmunoprecipitación se evaluó el rendimiento de la Remazol Brilliant Red BB agarosa como ayuda para la visualización en una aplicación de arrastre molecular basado en la afinidad. El experimento comparó Remazol Brilliant Red BB agarosa al 10 % en proteína A agarosa no coloreada estándar (Red Protein A agarosa) con proteína A agarosa no coloreada estándar al 100 % (n.º de producto Sigma P3391; proteína
55 A agarosa no coloreada) en términos de la inmunoprecipitación de una proteína de fusión recombinante añadida a un lisado de células de mamífero.

- [0098]** Se cultivaron células de cultivo de tejidos COS7 hasta confluencia en placas de cultivo de tejidos de 100 mm y se lavaron dos veces brevemente con 10 ml de solución salina tamponada con fosfato enfriada en hielo.

Después del segundo lavado, la solución se aspiró de las placas, se añadió 1 ml de tampón de lisis RIPA enfriado en hielo a cada placa y las células se lisaron y se recolectaron con un raspador de células. El lisado se retiró de cada placa y se mezcló en hielo. Se añadieron muestras de 1 ml en tubos, se sometieron a congelación rápida y se almacenaron a -70 °C.

5

[0099] Se añadieron alícuotas de 100 µl de una suspensión al 50 % de Red Protein A agarosa o proteína A agarosa no coloreada a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y se lavaron cuatro veces con 750 µl de tampón de lisis RIPA por lavado. Una vez retirado el sobrenadante del lavado final, los tubos con los sedimentos de resina de agarosa lavados se colocaron en hielo.

10

[0100] Se descongelaron los lisados congelados y se colocaron en hielo inmediatamente antes del experimento. El ADN desnaturalizado (en forma de un agregado viscoso) se retiró manualmente de cada muestra de 1 ml de lisado con una pipeta. Se añadieron a cada uno 100 µl de cóctel inhibidor de proteasa de mamíferos (n.º de producto Sigma P8340) y las muestras se mezclaron brevemente por agitación en un mezclador vorticial. Los desechos celulares y el precipitado de proteínas desnaturalizadas se separó por centrifugación en una microcentrífuga a 8000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes transparentes se retiraron cuidadosamente y se transfirieron a tubos limpios para la inmunoprecipitación.

15

[0101] En la mitad de los tubos de lisados limpios, se añadieron a cada uno 1,2 µl de 5,4 mg/ml de proteína de fusión recombinante purificada FLAG-BAP N-terminal (fosfatasa alcalina bacteriana) (n.º de producto Sigma P7582), se mezclaron suavemente y se colocaron en hielo. Se añadieron a cada tubo de lisado limpio 3,85 µl de anticuerpo monoclonal de ratón anti-BAP BAP-77 (2,6 mg/ml; n.º de producto Sigma B6804) y se mezclaron suavemente. Los tubos se pusieron a mezclar por rotación a 4 °C durante una hora para permitir la formación de los complejos antígeno-anticuerpo. Los tubos se centrifugaron durante 5 segundos y todo el contenido de cada uno se transfirió con una pipeta a un tubo independiente con sedimento de resina de agarosa lavado en hielo y se mezclaron brevemente. Estos tubos se pusieron a mezclar por rotación a 4 °C durante una hora para permitir que los complejos antígeno-anticuerpo se unieran a la proteína A agarosa.

25

[0102] Después de la incubación, las resinas de agarosa se recogieron por centrifugación en una microcentrífuga durante 30 segundos a 8.000 x g a 4 °C y los sobrenadantes se retiraron por aspiración. Cada sedimento se lavó cuatro veces con 750 µl de tampón RIPA enfriado en hielo por lavado. En cada lavado, los sedimentos se mezclaron por rotación a 4 °C durante 5 minutos, se centrifugaron como antes y los sobrenadantes se aspiraron. Seguidamente, se retiraron los sobrenadantes del lavado final, se añadieron 25 µl de tampón RIPA a cada uno y se mezclaron brevemente. A continuación, se añadieron a cada uno 25 µl de tampón de muestra de gel de proteína Laemmli 2X (n.º de producto Sigma S3401), se mezclaron y las muestras resultantes se hirvieron durante 5 minutos para liberar la proteína de las resinas de agarosa.

30

35

[0103] Las muestras se centrifugaron brevemente para sedimentar las resinas de agarosa y 10 µl de cada sobrenadante se sometieron a electroforesis SDS/PAGE en gel desnaturalizante y se analizaron por inmunotransferencia Western. En la inmunotransferencia Western se usó como sonda anticuerpo monoclonal conjugado anti-FLAG M2 con fosfatasa alcalina, seguido de detección colorimétrica NBT/BCIP estándar.

40

Resultados:

[0104] Los sedimentos de Red Protein A agarosa fueron muy visibles en luz ambiente, mientras que los sedimentos de proteína A agarosa no coloreada fueron difíciles de ver. La alta visibilidad de la Red Protein A agarosa hizo que todas las manipulaciones resultasen más fáciles y menos propensas a errores ocasionados por la retirada accidental de los sedimentos durante las aspiraciones. Los inmunoprecipitados de Red Protein A agarosa dieron la misma intensidad de señal en las inmunotransferencias para la proteína N-FLAG-BAP que los inmunoprecipitados de proteína A agarosa no coloreada, sin un aumento detectable en el fondo no específico. Así, la invención facilita significativamente una aplicación de arrastre molecular basado en la afinidad e inmunoprecipitación, al tiempo que proporciona un rendimiento equivalente al del procedimiento estándar.

50

REIVINDICACIONES

1. Una matriz de afinidad para el aislamiento de una molécula a partir de una solución acuosa, comprendiendo la matriz de afinidad un soporte polimérico en partículas que contiene una mezcla de partículas, en donde una primera fracción de partículas de la mezcla tienen un colorante unido covalentemente para permitir la detección óptica de la soporte polimérico, y una segunda fracción de partículas de la mezcla tienen un ligando de afinidad distinto del colorante unido para la captura de la molécula, en donde ninguna de las partículas de la mezcla contiene tanto el colorante como el ligando de afinidad.
2. La matriz de afinidad de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la primera fracción de partículas comprende entre el 1 % y el 15 % en peso del soporte polimérico en partículas y la segunda fracción de partículas comprende entre el 85 % y el 99 % en peso del soporte polimérico en partículas.
3. La matriz de afinidad de una acuerdo cualquiera de la reivindicación 1 o 2, en la que el colorante comprende un colorante que posee un cromóforo azo, un colorante que posee un cromóforo de antraquinona, o un colorante que posee un cromóforo de ftalocianina.
4. La matriz de afinidad de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el colorante se selecciona entre un grupo compuesto por ácido 5-[(4,6-dicloro-1,3,5-triazin-2-il)amino]-4-hidroxi-3-(fenilazo)-2,7-naftalenodisulfónico, sal disódica (Procion Red MX-5B), Procion Blue MXR, Remazol Violet R-4B, Procion Red MX-BRA, ácido 5-(acetilamino)-4-hidroxi-3-[[2-hidroxi-4-[[2-(sulfooxi)etil]sulfonil]fenil]azo]-2,7-naftalenodisulfónico, complejo de cobre (Remazol Brilliant Violet 5R), Procion Red MX-GBA, Blue MX-4RD (Navy Blue 21), Blue MX-2G (Cobalt Blue 22), Dharma Fire Red 10, ácido 6-(acetilamino)-4-hidroxi-3-[[3-[[2-(sulfooxi)etil]sulfonil]fenil]azo]-2-naftalenodisulfónico, sal disódica (Remazol Brilliant Orange 3R, Reactive Orange 16), Remazol Brilliant Red BB (Reactive Red 21), Procion Turquoise H-A, Remazol Brilliant Scarlet R-3G, Remazol Brilliant Orange R-FN, y Reactive Blue 21.
5. La matriz de afinidad de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el soporte polimérico comprende agarosa natural, agarosa reticulada, dextrano reticulado o poliacrilamida.
6. La matriz de afinidad de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la agarosa reticulada comprende partículas de entre 20 y 300 micrómetros de diámetro.
7. La matriz de afinidad de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la agarosa natural comprende partículas de entre 30 y 250 micrómetros de diámetro.
8. La matriz de afinidad de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el dextrano reticulado comprende partículas de entre 20 y 400 micrómetros de diámetro.
9. La matriz de afinidad de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la poliacrilamida comprende partículas de entre 30 y 150 micrómetros de diámetro.
10. La matriz de afinidad de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la cantidad de colorante que está acoplado al soporte polimérico comprende entre 1 micromol de colorante/cm³ de soporte polimérico y 6 micromoles de colorante/cm³ de soporte polimérico.
11. La matriz de afinidad de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que los ligandos de afinidad se seleccionan entre el grupo compuesto por estreptavidina, estreptavidina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de estreptavidina, avidina, avidina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de avidina, estreptactina, estreptactina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de estreptactina, extravidina, extravidina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de extravidina, neutravidina, neutravidina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de neutravidina, proteína A, una molécula con las propiedades de unión de la proteína A, proteína L, una molécula con las propiedades de unión de la proteína L, proteína G, una molécula con las propiedades de unión de la proteína G, proteína A/G, una molécula con las propiedades de unión de la proteína A/G, proteína L/A, una molécula con las propiedades de unión de proteína L/A, calmodulina, una molécula con las propiedades de unión de calmodulina, biotina, una molécula con las propiedades de unión de biotina, quelatos metálicos, glutatión, y anticuerpos.
12. La matriz de afinidad de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende

una mezcla de una matriz de afinidad no coloreada y un soporte polimérico coloreado, comprendiendo el soporte polimérico coloreado un polímero y un colorante unido al polímero.

13. La matriz de afinidad de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la matriz de afinidad no coloreada
5 comprende una matriz de unión de anticuerpos.
14. La matriz de afinidad de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la matriz de unión de anticuerpo se selecciona entre el grupo compuesto por proteína A agarosa, agarosa modificada con una molécula con las propiedades de unión de la proteína A, proteína G agarosa, agarosa modificada con una molécula con las
10 propiedades de unión de la proteína G, proteína L agarosa, agarosa modificada con una molécula con las propiedades de unión de la proteína L, proteína A/G agarosa, agarosa modificada con una molécula con las propiedades de unión de la proteína A/G, proteína L/A agarosa, y agarosa modificada con una molécula con las propiedades de unión de la proteína L/A.
15. La matriz de afinidad de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la matriz de afinidad no coloreada
15 comprende una matriz con anticuerpos unidos.
16. La matriz de afinidad de acuerdo con la reivindicación 15, en la que los anticuerpos se seleccionan entre el grupo compuesto por anticuerpos que tienen especificidad por al menos una parte de la secuencia de aminoácidos DYKDDDDK («DYKDDDDK»), antipolihistidina, anti-glutación-S-transferasa, anti-Myc-tag, anti-Avi-tag, anti-HA, anti-proteína verde fluorescente, anti-beta galactosidasa, anti-tiorredoxina, anti-proteína de unión a maltosa, anti-dominio de unión a celulosa, anti-glucoproteína del VSV, y anti-luciferasa.
17. La matriz de afinidad de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la matriz de afinidad no coloreada
25 comprende una matriz con ligandos de afinidad unidos.
18. La matriz de afinidad de acuerdo con la reivindicación 17, en la que los ligandos de afinidad se seleccionan entre el grupo compuesto por estreptavidina, estreptavidina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de estreptavidina, avidina, avidina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de avidina, estreptactina, estreptactina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de estreptactina, extravidina, extravidina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de extravidina, neutravidina, neutravidina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de neutravidina, proteína A, una molécula con las propiedades de unión de la proteína A, proteína L, una molécula con las propiedades de unión de la proteína L, proteína G, una molécula con las propiedades de unión de la proteína G, proteína A/G, una molécula con las
30 propiedades de unión de la proteína A/G, proteína L/A, una molécula con las propiedades de unión de proteína L/A, calmodulina, una molécula con las propiedades de unión de calmodulina, biotina, una molécula con las propiedades de unión de biotina, quelatos metálicos y glutatión.
19. Un procedimiento para el aislamiento de una biomolécula a partir de una solución acuosa de muestra, comprendiendo el procedimiento: la combinación de la solución acuosa con una matriz de afinidad de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, y la separación de la matriz de afinidad de la solución acuosa de muestra.
20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la matriz de afinidad se monitoriza
45 ópticamente durante la etapa de separación con el fin de evitar la pérdida de la matriz de afinidad.
21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la etapa de separación se lleva a cabo manualmente y la matriz de afinidad se monitoriza visualmente durante la separación con el fin de evitar la pérdida de la matriz de afinidad.
50
22. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en la que el ligando de afinidad se selecciona entre el grupo compuesto por estreptavidina, estreptavidina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de estreptavidina, avidina, avidina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de avidina, estreptactina, estreptactina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de estreptactina, extravidina, extravidina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de extravidina, neutravidina, neutravidina monomérica, una molécula con las propiedades de unión de neutravidina, proteína A, una molécula con las propiedades de unión de la proteína A, proteína L, una molécula con las propiedades de unión de la proteína L, proteína G, una molécula con las propiedades de unión de la proteína G, proteína A/G, una molécula con las propiedades de unión de la proteína A/G, proteína L/A, una molécula con las propiedades de unión de proteína L/A,
55

calmodulina, una molécula con las propiedades de unión de calmodulina, biotina, y una molécula con las propiedades de unión de biotina, quelatos metálicos, glutatión y anticuerpos.

23. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la solución de muestra acuosa que
5 contiene la biomolécula se añade a la matriz de afinidad.

24. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el procedimiento es una inmunoprecipitación.

10 25. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la biomolécula comprende una biomolécula de origen natural, una biomolécula sintética, una biomolécula de origen natural modificada o una biomolécula sintética modificada.

26. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, en el que la biomolécula se selecciona entre el
15 grupo compuesto por (i) péptidos, polipéptidos, proteínas individuales, glucoproteínas, enzimas, nucleótidos, polinucleótidos, polímeros de ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, y (ii) complejos que contienen una biomolécula del grupo (i).