



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 340 032**

51 Int. Cl.:
C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03816091 .7**
96 Fecha de presentación : **08.12.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1597269**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

54 Título: **Un método para generar ligandos de afinidad quelantes de metal.**

30 Prioridad: **28.02.2003 SE 2003100567**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.05.2010

73 Titular/es: **GE Healthcare Bio-Sciences AB.**
Björkgatan 30
751 84 Uppsala, SE

72 Inventor/es: **Andersson, Lars, C.;**
Axen, Andreas;
Gebru, Tesfai;
Maloisel, Jean-Luc y
Tedebark, Ulf

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 340 032 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

Un método para generar ligandos de afinidad quelantes de metal.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para generar ligandos de afinidad quelantes de metal, polidentados. La invención también incluye un método para generar un medio de separación que comprende tales ligandos, así como tales ligandos y tal medio.

10 **Fundamentos**

En cualquier industria química o de biotratamiento, la necesidad de separar y purificar un producto de una mezcla compleja es una etapa necesaria e importante en la línea de producción. Hoy en día, existe un amplio mercado de métodos en que la industria puede realizar estos objetivos, uno de los cuales es la cromatografía. La cromatografía es bastante adecuada para una variedad de usos en el campo de la biotecnología, puesto que puede separar mezclas complejas con gran precisión y también es adecuada para productos más delicados, tales como las proteínas, puesto que las condiciones bajo las que se realiza no son típicamente estrictas.

Un método de cromatografía, que es una técnica de separación especialmente sensible y también aplicable a la mayoría de los tipos de proteínas, es la cromatografía de afinidad a quelatos metálicos (MCAC, por sus siglas en inglés), también conocida como cromatografía de adsorción de iones metálicos inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés). Esta técnica se usa comúnmente en esquemas de purificación junto con otra etapa cromatográfica, tal como cromatografía de intercambio iónico (IEX, por sus siglas en inglés) y/o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés).

Más específicamente, la IMAC utiliza matrices que comprenden un grupo capaz de formar un quelato con un ión de metal de transición, quelato que se usa a su vez como ligando en cromatografía para adsorber un compuesto de un líquido. La resistencia a la unión en la IMAC se ve afectada fundamentalmente por las especies de ión metálico, el pH de los tampones y la naturaleza del ligando usado. Como los iones metálicos se unen fuertemente a la matriz, la proteína adsorbida se puede eluir o disminuyendo el pH o por elución competitiva.

En general, la IMAC es útil para la separación de proteínas u otras moléculas que presentan una afinidad por el ión de metal de transición de la matriz. Por ejemplo, las proteínas se unirán a la matriz en presencia de restos de histidina, cisteína y triptófano, accesibles, que presentan todos afinidad por el metal quelado.

Con la llegada de las técnicas biológicas moleculares, las proteínas son ahora fácilmente preparadas de antemano o marcadas con uno o más restos histidina para aumentar su afinidad a ligandos quelados de metal y, de acuerdo con esto, la cromatografía de quelatos metálicos ha asumido más recientemente un papel más importante en la purificación de proteínas.

Se han sugerido quelatos simples como ligandos para IMAC, tales como ácido iminodiacético (IDA). El IDA, acoplado a soportes de agarosa y cargado con posterioridad con diversos metales, tales como Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} , se ha usado para capturar proteínas y péptidos y también está disponible como resinas comerciales. Más específicamente, la patente de EE.UU. 4.551.271 (Hochuli, cedida a Hoffmann-La Roche Inc.) describe una resina de quelato metálico que comprende ligandos de IDA, en la purificación de interferón. La resina se puede definir por la siguiente fórmula:



50 en la que Me es Ni o Cu.

Los mejores resultados con esta resina se obtienen si el interferón se ha purificado ya parcialmente. La resina puede ser preparada según la memoria descriptiva, de una manera conocida, tratando la agarosa con epíclorhidrina o epibromohidrina, haciendo reaccionar el epóxido resultante con sal disódica de ácido iminoacético y convirtiendo el producto en la sal de cobre o de cinc por lavado con una disolución de cobre (II) o cinc.

Más recientemente, la patente europea EP 87109892.7 (F. Hoffmann-La Roche AG) y su patente de EE.UU. 4.877.830, equivalente, (Döbeli *et al*, cedida a Hoffmann-La Roche Inc.) describen un agente quelador tetradentado conocido como ácido nitrilotriacético (NTA) para uso con metales que tienen seis sitios de coordinación. Más específicamente, las matrices se pueden describir por la fórmula general [matriz portadora] - espaciador $\text{-NH}(\text{CH}_2)_x\text{-CH}(\text{COOH})\text{-N}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2\text{Ni}^{2+}$, en la que $x = 2\text{-}4$. La matriz descrita se prepara haciendo reaccionar un compuesto de aminoácido de la fórmula $\text{R-HN}(\text{CH}_2)_x\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$, en la que R es un grupo aminoprotector y x es 2, 3 ó 4, con ácido bromoacético en medio alcalino y con posterioridad, después de una etapa de purificación del compuesto intermedio, separando por escisión el grupo protector y haciendo reaccionar este grupo con una matriz activada. De acuerdo con esto, el método de preparación implica etapas separadas para alquilar y desproteger el aminoácido, etapas que hacen que el método exija mucho tiempo y sea, por lo tanto, costoso. Además, la química de alquilación es menos eficaz y después de la desprotección, el producto no está bien definido con respecto a productos de soporte de

la neutralización y escisión. Siguiendo a esto, el material se acopla a un soporte sólido que soporta funcionalidades carboxilo por formación de un enlace amido. Sin embargo, este procedimiento puede implicar desventajas, puesto que el medio obtenido presenta el ligando quelante deseado, inmovilizado, así como algunos grupos carboxílicos no reaccionados, proporcionando así un medio heterogéneo. Además, los compuestos de aminoácido mono-N-protectidos son materiales de partida caros, que hacen el método total incluso más costoso.

Finalmente, la patente internacional WO 01/81365 (Sigma-Aldrich Co.) describe una composición de quelante metálico que, según la memoria descriptiva, es capaz de formar quelatos relativamente estables con iones metálicos y presenta una selectividad mejorada para proteínas marcadas con polihistidina. Según dicha patente internacional WO 01/81365, la unión entre el quelante y la resina es un parámetro importante para la selectividad y el ligado es un éter neutro, un tioéter, un selenoéter o una amida. Las composiciones descritas se acoplan a un portador insoluble, tal como Sepharose™ según ejemplos dados. El medio cromatográfico se produce de dos maneras diferentes; o por una reacción en fase sólida directamente sobre el soporte sólido preactivado usado finalmente en el medio cromatográfico o por una síntesis en disolución separada del producto intermedio N,N,N',N'-tetrakis(carboximetil)-L-cistina que se acopla finalmente al soporte sólido.

La síntesis en fase sólida se lleva a cabo por adición de L-cisteína a un gel de Sepharose™ previamente activado de epíclorhidrina, en condiciones alcalinas, durante un tiempo de reacción prolongado (18 h), seguido por lavados. Después se añade ácido bromoacético, de nuevo en condiciones alcalinas y un tiempo de reacción prolongado (72 h) y seguido de nuevo por lavados y finalmente taponando los grupos amino libres, restantes, presentes en el gel con anhídrido de ácido acético.

La síntesis en fase sólida de esta manera ofrece un control deficiente de la reacción y potenciales reacciones secundarias y proporciona de ese modo un producto menos homogéneo.

La ruta alternativa, contando con la síntesis en fase disolución de un producto intermedio, empieza con la adición de un gran exceso (40 veces) de ácido glioxílico a L-cisteína en un tampón de borato alcalino. El producto intermedio, después de manipulaciones del pH y ajuste de la conductividad de la mezcla de reacción, se purificó después con cromatografía de intercambio iónico para proporcionar N,N,N',N'-tetrakis(carboximetil)-L-cistina.

Antes del acoplamiento a un soporte sólido se tiene que reducir la N,N,N',N'-tetrakis(carboximetil)-L-cistina a N,N-bis(carboximetil)-L-cisteína usando tris(carboxietil)fosfina en condiciones alcalinas. Este material se puede usar finalmente para acoplamiento a un soporte sólido preactivado que forme el medio cromatográfico. Este método de síntesis se elabora y depende de un gran exceso de reactivos para formar el producto deseado que se purifica finalmente en condiciones cromatográficas específicas, seguido por la reducción como etapa sintética adicional y es menos adecuado de ese modo para uso en producción a gran escala.

De acuerdo con esto, aún hay necesidad de métodos mejorados para la síntesis de ligandos IMAC así como de métodos para su inmovilización a una matriz de base.

Compendio de la presente invención

Así, un objeto de la presente invención es un método mejorado de generación de ligandos de afinidad quelantes de metal, polidentados, para posterior acoplamiento a una matriz de base, método que utiliza materiales de partida y reactivos de coste eficaz y fácilmente disponibles y proporciona altos rendimientos. Esto se puede conseguir como se define en la reivindicación 1.

Otro objeto de la presente invención es permitir una selección cuidadosa de los ligandos que se inmovilizan sobre una matriz de base para uso en IMAC. Esto se puede conseguir por un método de generación de un medio de separación que comprende ligandos de afinidad quelantes de metal, polidentados, acoplados a una matriz de base, en la que la química de acoplamiento está bien definida y es fácil de controlar. Un objeto más de la invención es proporcionar dicho método, que da como resultado un producto homogéneo.

Otro objeto más de la invención es proporcionar un método como se discutió anteriormente, que permita también introducir dos o más funcionalidades, funcionalidades que pueden ser de la misma clase o diferentes.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar ligandos para cromatografía de afinidad a metales inmovilizados, ligandos que presentan una manipulación mejorada para el acoplamiento a una matriz de base y, por lo tanto, una eficacia de acoplamiento mejorada, cuando se compara con ligandos de la técnica anterior.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un medio cromatográfico que en su uso para cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) proporciona una pequeña filtración de iones metálicos.

Otro objeto de la invención es proporcionar un método para generar una colección diferente de ligandos de afinidad quelantes, metálicos, basada en el mismo armazón, método que se puede usar para la optimización de ligandos hacia una aplicación específica.

ES 2 340 032 T3

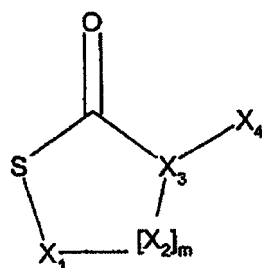
Los objetos de la invención se pueden conseguir por una o más de las reivindicaciones adjuntas. Se mostrarán otros objetos, ventajas y realizaciones de la presente invención a partir de la descripción detallada que sigue.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona una ilustración esquemática de la ruta general para producir un medio de separación que comprende ligandos de cromatografía de afinidad a quelatos metálicos polidentados según la invención.

La Figura 2 (a) y (b) ilustra la purificación de Proteína de Unión a Maltosa con (His)₆-cola (MBP-His) usando medio de separación IMAC preparado según la invención. Más específicamente, la Figura 2(a) es el cromatograma, mientras que la Figura 2(b) es un aumento de la parte del gradiente de dicho cromatograma. En la Figura 2, la curva a A280 nm se indica A, el porcentaje (%) de tampón de elución se indica B y la conductividad se indica C.

La Figura 3 muestra análisis SDS-PAGE de fracciones de purificación IMAC de MBP-His. La numeración de la fracción como en el cromatograma de la Figura 2.



La Figura 4 muestra un cromatograma de ensayo, en el que UV 372 nm = A, Conductividad = B, Inyección = C. La capacidad de unión a níquel de este prototipo se determinó a 16 μmoles de Ni/ml y la filtración de metal al 4%.

La Figura 5 muestra los resultados del ensayo de capacidad del níquel realizado en un medio de separación según la invención, como se describe en el Ejemplo 5.

Definiciones

La terminología “medio de separación” se usa en la presente memoria para un material útil por ej., como empaquetamiento de una columna cromatográfica y más específicamente consiste en uno o más ligandos acoplados a una matriz de base. Así, la matriz de base actúa como portador, mientras los ligandos proporcionan funcionalidades que interactúan con sustancias diana en cromatografía.

La terminología “espaciador” se usa para una entidad química que distancia un ligando de la matriz de base.

La terminología “ligando” significa en la presente memoria una entidad química capaz de unir sustancias diana. Tales sustancias diana pueden ser tanto un compuesto, que se desea para aislar o retirar por cromatografía, como alternativamente una sustancia diana analítica.

La terminología ligandos “quelantes de metal polidentados” se refiere a ligandos con dos o más átomos donadores que se pueden coordinar a, es decir, quelar, un metal simultáneamente. Así, un ligando polidentado presenta dos o más átomos donadores y ocupa dos o más sitios en una esfera de coordinación.

Así, la terminología “funcionalidades quelantes de metal” se refiere a los grupos que proporcionan átomos donadores. Normalmente, las funcionalidades están distanciadas entre sí y, por lo tanto, la terminología “brazo de ligando” se usa para cada funcionalidad.

La terminología “gel” se usa para una matriz de separación, que está en forma de gel.

Descripción detallada de la invención

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para generar al menos un ligando de afinidad quelante de metal, polidentado, método que comprende las etapas de:

(a) proporcionar al menos un armazón definido por la fórmula general (I)

en la que X₁, X₂ y X₃ indistintamente unos de otros, son átomos de carbono o heteroátomos con hibridación sp² o sp³,

X₄ es un nucleófilo y

ES 2 340 032 T3

m es un número entero de 0-2;

- (b) proporcionar al menos un brazo de ligando de afinidad quelante de metal, polidentado, opcionalmente en una forma en la que las funcionalidades quelantes de metales están protegidas en cada armazón por derivación de los grupos X_4 nucleofílicos de dichos armazones por adición de un agente de derivación que es un éster protegido halogenado al tiempo que se mantiene la estructura cíclica del armazón;
- (c) abrir el anillo por hidrólisis del enlace entre el carbonilo y el azufre del armazón derivado por adición de una base que adiciona uno o más brazos de ligando de afinidad quelante de metal al armazón y, si se requiere,
- (d) desproteger las funcionalidades del (de los) brazo(s) de ligando proporcionado(s) en la etapa (b).

El armazón de la etapa (a) se puede proporcionar como un sólido o preferiblemente en un disolvente. En la realización más ventajosa, en la fórmula (I), X_1 , X_2 y X_3 son átomos de carbono. En realizaciones alternativas, uno o más de X_1 , X_2 y X_3 son heteroátomos, es decir, se seleccionan del grupo que comprende: oxígeno, azufre, nitrógeno y/o sílice, siempre que dicho heteroátomo no interfiera en el uso posterior de los ligandos.

En la fórmula (I), X_4 es cualquier grupo nucleófilo adecuado que permite la derivación. Así, en una realización ilustrativa, X_4 se selecciona de un grupo tal como -OH, -SH o -NH₂. En una realización ventajosa, X_4 es -NH₂.

Como se mencionó anteriormente, m puede ser un número entero de 0-2, es decir, 0, 1 ó 2. Como se muestra a partir de las etapas del método, el valor de m decidirá el número de átomos entre los brazos de ligando y su punto de unión a una matriz de base cuando se desarrolla en un medio de separación.

En una realización ventajosa, en la fórmula (I), m es 1 y el armazón es la homocisteína tiolactona. Como apreciará el experto en este campo, se puede usar homocisteína tiolactona en forma pura o de racemato. La homocisteína tiolactona está comercialmente disponible en, por ej., Aldrich, catálogo n° H1, 580-2 y CAS n° 6038-19-3.

En la etapa (b), la derivación se realiza por adición de un agente de derivación adecuado constituido por una primera parte, que es electrófila y, por lo tanto, capaz de reaccionar con X_4 de Fórmula (I) y una segunda parte, que comprende una funcionalidad quelante de metal.

La primera parte del agente de derivación, es decir, la parte electrofílica, se puede ilustrar por C=C; C-Y, en la que Y representa, por ejemplo, un halógeno, tal como Br, I, Cl o un mesilato o un grupo tosilato o un ácido o un ácido activado tal como WC=O, en el que W se forma por ejemplo a partir de N-hidrosuccinimida, pentafluorofenol, paranitrofenol o cloroformiato de isopropilo.

En una realización ventajosa, la derivación se proporciona por adición de dos agentes de derivación, cada uno de los cuales comprende funcionalidades quelantes de metal, diferentes o idénticas, indicados en la presente memoria como L_1 y L_2 . En esta realización, las partes electrofílicas de los agentes son preferiblemente de la misma naturaleza para facilitar la derivación. En una realización alternativa, se introducen más de dos funcionalidades quelantes de metal, diferentes o idénticas, por derivación de X_4 , preferiblemente por el uso de dos o más etapas diferentes, como se realiza por el experto en este campo. De acuerdo con esto, se proporcionan fácilmente múltiples funcionalidades en el mismo ligando de afinidad quelante de metal, polidentado.

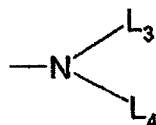
El(los) agente(s) de derivación usado(s) en el método presente puede(n) tanto comprender la funcionalidad quelante de metal en forma protegida, en la que los átomos donadores no están disponibles para reacción durante la derivación del armazón, como en forma no protegida. En la realización donde está protegida la funcionalidad, dicho grupo protector debería ser fácil de eliminar en una etapa posterior. De acuerdo con esto, el grupo protector es tanto lábil a ácido, tal como un grupo alquilo, como lábil a álcali, tal como un grupo terc-butilo. En una realización, el grupo protector es un grupo CH₂CH₃. En este campo se conocen diversas funcionalidades quelantes de metal y en principio pueden ser cualquier grupo donador de electrones. Más específicamente, las funcionalidades quelantes de metal usadas en el presente método se seleccionan del grupo que consiste en: compuestos aromáticos, derivados heterocíclicos tales como piridina, tiofeno, furano e imidazol, ácidos, ésteres, cetonas, amidas, sulfonas, sulfonamidas, nitrilo, dobles y triples enlaces carbono-carbono.

En una realización ilustrativa, el agente de derivación es un éster de ácido carboxílico halogenado, tal como un éster alquílico de ácido carboxílico halogenado. Como se mencionó anteriormente, en una realización más específica, X_4 es NH₂. Los métodos para hacer reaccionar un grupo NH₂ con un grupo que soporta un halógeno u otro grupo saliente, son conocidos en este campo y se realizan convenientemente a temperatura normal en un disolvente tal como N,N-dimetilformamida (DMF). En una realización, para proporcionar dos brazos de ligando de afinidad quelante de metal en cada armazón por la derivación, el agente de derivación se usa en una relación molar de 2:1 al armazón. El experto puede controlar fácilmente la reacción y confirmar la derivación obtenida por un método convencional tal como LC-MS. Así, la presente invención proporciona una ruta sintética menos compleja para ligandos de afinidad quelantes de metal, polidentados, que la patente internacional WO 01/81365. Debido a la química ventajosa, el presente método también da como resultado un producto más homogéneo. Los rendimientos obtenidos según el presente método pueden ser tan altos como 90% y los materiales de partida están actualmente fácilmente disponibles a un coste razonable.

ES 2 340 032 T3

En la etapa (c), se proporciona apertura de anillo en el enlace entre el carbonilo y el azufre del armazón derivado por adición de un reactivo, que añade uno o más brazos de ligando de afinidad quelante de metal del armazón. Así, la estructura cíclica se abre para proporcionar uno o más brazos de ligando quelante de metal, adicionales.

5 La apertura del anillo también dará como resultado una llave disponible para el acoplamiento posterior a una matriz de base en forma del grupo tiofílico, que debido a su naturaleza nucleofílica proporciona la química de acoplamiento conveniente. En una realización ventajosa, la apertura del anillo es hidrólisis por adición de hidróxido alcalino, tal como NaOH, en cuyo caso el carbonilo del armazón se transforma en un grupo carboxílico. Sin embargo, como entenderá el experto en este campo, si se realiza la apertura del anillo con un reactivo diferente, se puede introducir
10 una o más funcionalidades quelantes de metal, diferentes. En una realización alternativa, la apertura del anillo es aminólisis, en cuyo caso el nitrógeno soporta una o más funcionalidades quelantes de metal. En esta realización, el reactivo se define por la fórmula general II:



Fórmula 2

20

en la que L_3 y L_4 comprenden funcionalidades quelantes de metal, que pueden ser iguales o diferentes. Además, en una realización, dichos brazos de ligando L_3 y L_4 son iguales que los proporcionados en la etapa (b) por la derivación.

25 Así, como se indicó anteriormente, en la realización en que las funcionalidades L_1 y L_2 quelantes de metal estaban protegidas durante la etapa de derivación, se realiza preferiblemente una etapa de desprotección. En una realización, dicha desprotección se realiza como una etapa separada que sigue a la etapa (c) y se puede conseguir por adición de una base o un ácido, como se indicó anteriormente. La química útil para la protección/desprotección de funcionalidades son conocidas en este campo y el experto en este campo puede realizar fácilmente tales etapas.

30 En una realización especialmente ventajosa del presente método, la desprotección se realiza en la misma etapa que la apertura del anillo, es decir, esencialmente simultáneamente. De acuerdo con esto, la gran ventaja de esta realización es que se pueden generar ligandos de afinidad quelantes de metal, polidentados, usando un procedimiento simple que sólo comprende dos etapas. Por consiguiente, esta realización proporciona un método menos complejo que los métodos de la técnica anterior para la síntesis de ligandos de afinidad quelantes de metal, polidentados. En una realización, en la que el agente de derivación comprende un grupo lábil a álcalis, esta etapa se proporciona por adición de hidróxido de sodio. La hidrólisis se realiza ventajosamente a temperatura normal durante, por ej., 1-2 horas. De hecho, los presentes autores también han demostrado que incluso aunque todo el material de partida se pueda convertir en 90 minutos, unas 48 horas adicionales no dan lugar a subproductos. De acuerdo con esto, la hidrólisis según la invención da como resultado un producto estable, homogéneo y bien definido. En una realización alternativa, en la que el agente de derivación comprende un grupo lábil a ácido, en la etapa (c), esta etapa se proporciona por adición de un ácido, tal como HCl.

45 En una realización específica, en el presente método, las etapas (a) y (b) se han realizado antes para proporcionar un armazón fácilmente derivado. De acuerdo con esto, la presente invención también incluye un método, en el que la carboximetilación del armazón se ha realizado antes.

50 En una realización ventajosa, el producto así obtenido se acopla mediante su azufre a una matriz de base para producir un medio de separación. (Para una revisión general de métodos de inmovilización, especialmente acoplamiento mediante azufre, véase, por ej., *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Hermanson *et al.* 1.992, Greg. T. Hermanson, A. Krishna Mallia y Paul K. Smith, Academic Press, INC: Capítulo 3 y especialmente 3.4.1.2). Tal medio de separación es útil para el aislamiento de sustancias diana, para fines analíticos, etc. La matriz de base usada en el presente método puede ser de cualquier material adecuado para el uso deseado.

55 Así, en el caso en que se desea el medio de separación para uso en cromatografía de afinidad a quelatos metálicos inmovilizados, la matriz de base está comúnmente en forma de cuentas o monolítica y hecha de polímeros naturales, por ej., agarosa o dextrano o polímeros sintéticos, tales como divinilbenceno o estireno. La matriz de base puede estar, por ej., en forma de gel. En lo que se refiere a polímeros naturales, las cuentas de polímero poroso, adecuadas, de los mismos, tanto se realizan fácilmente por el experto en este campo de acuerdo con métodos clásicos, tales como gelificación de suspensión inversa (S Hjertén: *Biochim Biophys Acta* 79(2), 393-398 (1.964) como por la técnica de disco giratorio (véase por ej., la patente internacional WO 88/07414 (Prometic Biosciences Inc.)). Alternativamente, las cuentas de polímeros naturales se obtienen de fuentes comerciales tales como Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia. Los nombres comerciales ilustrativos de tales cuentas de polímeros naturales, útiles, son, por ej., de la clase conocida como SepharoseTM o SephadexTM.

ES 2 340 032 T3

En lo que se refiere a los polímeros sintéticos, la matriz de base está constituida por polímeros sintéticos reticulados tales como estireno o derivados de estireno, divinilbenceno, acrilamidas, ésteres de acrilato, ésteres de metacrilato, ésteres de vinilo, vinilamidas, etc. Tales polímeros se producen fácilmente según métodos clásicos, véase, por ej., "Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization" (R. Arshady: *Chimica e L'Industria* 70(9), 70-75 (1.988). Alternativamente, un producto comercialmente disponible, tal como SourceTM (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) se puede modificar superficialmente según la invención.

En realizaciones alternativas, la matriz de base puede ser, por ej., una membrana, un filtro, uno o más fragmentos pequeños, superficies, capilares, etc.

En una realización, los grupos reactivos de la matriz de base son grupos alilo, es decir, dobles enlaces carbono-carbono. En una realización, se usa una matriz de base comercialmente disponible que ya presente grupos alilo. En una realización alternativa, los grupos alilo se proporcionan de acuerdo con métodos conocidos. Así, en una realización ilustrativa, la presente matriz de base se ha alilado por tratamiento con un epóxido que soporta una funcionalidad alilo a temperaturas y tiempos de reacción adecuados. Un ejemplo de tal epóxido con funciones alilo, usado normalmente, es el alil glicidil éter (AGE). De acuerdo con esto, en una realización específica, en la etapa (d), el grupo azufre del ligando se acopla a la matriz de base mediante el grupo alilo activado de alil glicidil éter (AGE). En esta realización, en el producto final, el grupo azufre se unirá a la matriz de base por un espaciador que comprende grupos éter y grupos hidroxilo y el medio de separación se puede definir como matriz de base -O-CH₂-CHOH-CH₂-O-CH₂-CHOH-CH₂-S-ligando.

En realizaciones alternativas, se usan otras técnicas de acoplamiento conocidas de ligandos que contienen tiol, tales como la apertura de epóxido o adición de radicales a dobles enlaces.

En una realización específica, dichos grupos alilo se activan por bromación o alternativamente, el acoplamiento es una reacción por radicales libres. El radical libre usado puede ser cualquier iniciador comercialmente disponible, adecuado, UV, etc.

Un segundo aspecto de la presente invención es un ligando de afinidad quelante de metal, polidentado o un medio de separación que comprende al menos uno, preferiblemente una pluralidad de, ligandos de afinidad quelantes de metal, polidentados, acoplados a una matriz de base, medio que se ha generado por un método como se describió anteriormente. En una realización específica, los ligandos de afinidad quelantes de metal son tridentados. Tal medio de separación se puede cargar después con un ión de metal adecuado, tal como Cu (II), Zn (II), Ni (II), Ca (II), Co (II), Mg (II), Fe (III), Al (III), Ga (III), Sc (III), etc., y se usa de acuerdo con principios conocidos de IMAC, por ej., como se indica en líneas generales en la sección "Fundamentos" anterior. En la realización más preferida, se usa Ni²⁺.

En una realización ventajosa, los presentes ligandos de afinidad quelantes de metal, polidentados, son ligandos tridentados, se definen por la fórmula:



En una realización específica, el presente medio de separación, que comprende ligandos de afinidad quelantes de metal, polidentados, acoplados a una matriz de base, se define por la fórmula general:



en la que n es un número entero de 2-4. En una realización, n=2. En este contexto, se entiende que si la matriz de base está por ej., en forma de una partícula, entonces se acoplará una pluralidad de ligandos a cada partícula, como se describió anteriormente.

Un tercer aspecto de la invención es el uso de homocisteína tiolactona como material de partida en la preparación de ligandos quelantes de metal, polidentados, es preferiblemente el método descrito anteriormente. La invención también incluye el uso de un armazón carboximetilado tal como homocisteína tiolactona en la preparación de ligandos quelantes de metal, polidentados. En la realización más ventajosa, dicho uso es como se definió anteriormente. Como se mencionó anteriormente, la homocisteína tiolactona está comercialmente disponible.

Un aspecto más de la presente invención es un estuche, que comprende un armazón como se define por la fórmula (I) general anterior, estuche que comprende dicho armazón en un estado sólido junto con instrucciones, preferiblemente escritas, para su uso en la elaboración de ligandos de afinidad quelantes de metal o un medio de separación que comprende ligandos de afinidad quelantes de metal polidentados acoplados a una matriz de base. En una realización alternativa, un estuche de acuerdo con la invención comprende cualquier otra forma del armazón, tal como un armazón derivado parcial o totalmente, junto con líquidos y/o reactivos adecuados para realizar el método según la invención. En una realización específica, un estuche está constituido por un armazón reaccionado según el presente método excepto la desprotección, en cuyo caso el estuche también comprende un reactivo adecuado para desprotección, tal como una base o un ácido, junto con instrucciones de uso.

La presente invención también incluye una columna cromatográfica empaquetada con un medio según la invención. La columna puede ser de cualquier tamaño, tal como para producción a gran escala o a escala de laboratorio o adecuada para fines analíticos. La columna también se puede combinar con medio de separación y opcionalmente líquidos en un segundo tipo de estuche, que también está incluido en la presente invención. En una realización, el estuche según la invención comprende iones metálicos, tales como iones Ni^{2+} .

Además, la presente invención también se refiere a un procedimiento para separar una sustancia diana de un líquido, proceso que comprende proporcionar un medio de separación como se definió anteriormente, cargar dicho medio con iones de metal adecuados para formar quelatos y poner en contacto dicho medio con el líquido para adsorber la sustancia diana en los mismos. En una realización ventajosa, el proceso también comprende una etapa de elución de la sustancia diana del medio de separación por adición de un líquido que desorbe el compuesto diana del medio de separación. En una realización, la elución se obtiene por el uso de un líquido que comprende un gradiente de pH descendente o por aplicación de un gradiente que da una concentración de imidazol creciente. Los principios generales de cromatografía para separar una sustancia diana como se discutió anteriormente, son conocidos en este campo (véase por ej., *Protein Purification - Principles, High resolution methods and Applications* (J-C Jansson y L. Ryden 1.989 Editorial VCH) y el experto en este campo puede adoptar fácilmente los parámetros necesarios para el uso del presente proceso.

Finalmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para generar una o más colecciones diferentes de ligandos de afinidad quelantes de metal para fines de detección sistemática y optimización. Así, en este procedimiento, se puede mantener constante un brazo que soporta un dentado mientras se seleccionan otros brazos en términos de realización óptima. Como entenderá el experto, por ejemplo se puede variar uno o más de los L_1 , L_2 , L_3 y L_4 discutidos anteriormente, para identificar la forma óptima y con posterioridad, una vez que se ha identificado la forma optimizada, se mantiene constante mientras se varía(n) otra(s). De acuerdo con esto, el procedimiento de optimización proporciona una herramienta para preparar un medio de separación que comprende ligandos seleccionados, óptimos.

Descripción detallada de los dibujos

La Figura 1 proporciona una ilustración esquemática de la ruta general para producir un medio de separación que comprende ligandos de cromatografía de afinidad a quelatos metálicos, polidentados, según la invención. La primera etapa corresponde a la etapa (b) del presente método, es decir, una derivación, la segunda etapa es una hidrólisis para abrir el anillo del armazón derivado y la última etapa es la inmovilización, es decir, el acoplamiento del ligando así producido a una matriz de base. Como se muestra en lo anterior, la segunda etapa es ventajosamente una apertura de anillo y desprotección combinadas. En la Figura 1, R indica tanto hidrógeno como alternativamente un grupo protector lábil de ácido o base.

La Figura 2 (a) y (b) ilustra la purificación de Proteína de Unión a Maltosa con $(\text{His})_6$ -cola (MBH-His) usando medio de separación IMAC, según la invención. Más específicamente, la Figura 2 (a) es el cromatograma, mientras la Figura 2 (b) es un aumento de la parte de gradiente de dicho cromatograma. En la Figura 2, la curva a A280 nm se indica A, el porcentaje (%) de tampón de elución se indica B y la conductividad se indica C.

La Figura 3 muestra los análisis SDS-PAGE de fracciones de purificación IMAC de MBP-His. La numeración de la fracción como en el cromatograma de la Figura 2.

La Figura 4 muestra un cromatograma de ensayo, en el que UV 372 nm = A, Conductividad = B, Inyección = C. La capacidad de unión a níquel de este prototipo se determinó a 16 μmoles de Ni/ml y la filtración de metal a 4%, como se explica en el ejemplo 5 más adelante.

La Figura 5 muestra los resultados del ensayo de capacidad de níquel realizado en un medio de separación según la invención, como se describe en el Ejemplo 5. Más específicamente, el eje X muestra la densidad del ligando mientras el eje Y muestra la unión a níquel. Se muestra claramente que la capacidad de unión a níquel aumenta linealmente con la densidad del ligando y que la pendiente es próxima a uno.

Parte experimental

Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos sólo y no se deberían interpretar como limitantes del alcance de la presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Parte experimental

Se registraron espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , correlación-CH, APT y cosy en escala δ (ppm) con Bruker, 300 MHz, usando TMS como referencia. Todos los espectros se registraron en CDCl_3 a menos que se indique de otro modo. Se realizó TLC usando placas de F_{254} de gel de sílice precubierto de Merck. Se usó ninhidrina o una mezcla de Mo/Ce para visualizar las manchas en placas TLC. Se registraron datos LC-MS usando electropulverización MSD de Hewlett Packard 1100. Las purificaciones cromatográficas de columna por desorción súbita se realizaron usando gel de sílice de Merck G-60.

ES 2 340 032 T3

Ejemplo 1

Carboximetilación del armazón para proporcionar N,N-bis(éster etil-carboximetílico)+/-homocisteína tiolactona

5 En un matraz de 250 ml, seco, se disolvió la homocisteína tiolactona D/L (4,5 g; 29,22 mmoles) en 100 ml de DMF. A esto se añadió éster etílico del ácido bromoacético (9,76 g; 58,44 mmoles, 6,48 ml), KI (4,850 g; 29,22 mmoles) y NaHCO₃ (14,727 g; 175 mmoles). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura normal. La reacción fue seguida por TLC (tolueno:acetato de etilo 3:1) y datos LC-MS. La reacción terminó después de 3,5 h.

10 El producto deseado tiene una R_f=0,35 (tolueno:acetato de etilo 3:1). Se evaporó el disolvente, se redisolvió el sólido resultante en CHCl₃, se extrajo con H₂Ox2. Finalmente se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó. Se purificó el producto en cromatografía de columna por desorción súbita (tolueno:acetato de etilo 3:1). Rendimiento: 7,636 g (26,422 mmoles), 90%.

15 RMN de ¹H: δ 1,52 (t, 6H, CH₃-CH₂-O-), δ 2,05-2,56 (m, 2H, -S-CH₂-CH₂-CH-C=O), δ 3,25 (m, 2H, -S-CH₂-CH₂-CH-C=O), δ 3,52 (s, 4H, -N-CH₂-N-CH₂-), δ 3,65 (dd, 1H, S-CH₂-CH₂-CH-C=O), δ 4,24 (m, 4H, CH₃-CH₂-O-); RMN de ¹³C: δ 14,71 (CH₃-CH₂-O-), δ 27,42 (S-CH₂-CH₂-CH-C=O), δ 29,68 (S-CH₂-CH₂-CH-C=O), δ 54,01 (CH₃-CH₂-O-), δ 60,99 (-N-CH₂-N-CH₂-), δ 67,15 (-S-CH₂-CH₂-CH-C=O), δ 170,94 (O=C-CH₂-N-CH₂-C=O), δ 207,20 (-S-CH₂-CH₂-CH-C=O). LC-MS: M⁺ 290.

20

Ejemplo 2

Hidrólisis para proporcionar N,N-bis(carboximetil)+/-homocisteína y ensayo de estabilidad

25 Se disolvió en 1 ml de NaOH 1 M, N, N-bis(éster etil-carboximetílico)+/- homocisteína tiolactona (50 mg; 0,173 mmoles), preparada como se describe en el ejemplo 1 anterior.

30 En un matraz de 100 ml. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura normal durante 100 minutos. Se siguió la reacción hasta la terminación hasta que no se veía material de partida según LC-MS.

35 Ensayo de estabilidad: Después de la hidrólisis completa, se diluyó la mezcla de reacción anterior a 5 ml con H₂O. Se ajustó el pH a 12,5 y se calentó la mezcla de reacción a 50°C con agitación. Se retiró una muestra de 50 μl de la mezcla con intervalos de 1 h, durante cuatro horas. Después se mezcló cada muestra de 50 μl con 1 ml de MeOH para el análisis LC-MS. Después de esta etapa, se permitió que la mezcla de reacción reposara durante la noche y finalmente se retiró una muestra de 50 μl para el análisis LC-MS, como se describió anteriormente. No se observó descomposición durante el tiempo del experimento. El producto bruto se liofilizó.

40 RMN de ¹H (D₂O): δ 1,52 (m, 2H, -CH-CH₂-CH₂-SH), δ 2,24 (m, 2H, -CH-CH₂-CH₂-SH), δ 3,20 (m, 5H, O=C-CH₂-N-CH-); RMN de ¹³C (D₂O): δ 22,34 (-CH-CH₂-CH₂-SH), δ 35,39 (-CH-CH₂-CH₂-SH), δ 57,33 (O=C-CH₂-N-CH₂-), δ 67,30 (-CH-CH₂-CH₂-SH), δ 180,55 (O=C-CH₂-N-CH₂-C=O), δ 181,84 (-N-CH-C=O); LC-MS: M⁺ 252.

Ejemplo 3

45

Acoplamiento del producto obtenido a partir del ejemplo 2 a agarosa alilada usando AGE

50 Se agitaron 10 ml de HP-alilo Sepharose™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) (44 μmoles/ml de gel) en 20 ml de agua destilada, con 1 g de NaOAc. Se añadió Br₂ ac., saturado, hasta que se formó un color amarillo persistente. Después se añadió formiato de sodio hasta que desapareció el color amarillo. Después se lavó el gel con agua destilada. Se agitó N, N-bis(éster etilcarboximetílico)+/-homocisteína tiolactona (102 mg) en 2 ml de NaOH 1 M a temperatura normal, durante 2 horas. Se añadieron 5 ml de agua destilada y 3 ml de NaHCO₃ 1 M y se ajustó el pH a 11,0 con NaOH 2 M.

55 Después se añadió la disolución de ligando al gel drenado en un vial, que se tapó.

Se agitó el vial a 50°C, durante 16 h, después se lavó el gel con agua destilada en un embudo de filtro de vidrio.

60

65

ES 2 340 032 T3

Ejemplo 4

Purificación de Proteína de Unión a Maltosa con (His)₆-cola (MBP-His) usando un medio de separación de IMAC generado según la invención y ensayo de filtración de metal

5

Materiales y métodos

Extracto con MBP-His

10 La Proteína de Unión a Maltosa con cola de hexaHis C-terminal, MBP-His, Mr teórica y pI fue 43 781 y 5,4:

Se realizó la fermentación de MBP-His que expresa un clon de *E. Coli* y la homogenización de las células según un procedimiento clásico. Se estimó la concentración de MBP-His en este extracto a aproximadamente 1,9 mg/ml.

15 *Tampón IMAC A*

Para un litro: (se especifica un comprimido de PBS para 1.000 ml de agua para dar fosfato de Na 10 mM, NaCl 140 mM y KCl 3 mM, pH 7,4). Se disolvieron dos comprimidos de PBS en agua, se añadió NaCl de patrón 5 M para dar unos 720 mM extra (así finalmente 140+140+720 mM = 1 M), pH ajustado a 7,4 con NaOH y volumen final a 20 1.000 ml. (El tampón también contiene KCl 6 mM).

Tampón de Elución (tampón IMAC B)

Preparado de la misma manera que el tampón IMAC A, pero también se añadió imidazol a 500 mM (de patrón de 25 imidazol - HCl 2,0 M, pH 7,4) antes de ajuste final de pH y volumen.

Disolución de sulfato -Ni²⁺: 100 mM en agua. Filtro de 0,2 um, pH=4,6.

30 Tampón de muestra y condiciones de funcionamiento según instrucciones para ExcelGel™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

Geles: SDS ExcelGel™, gradiente 8-18%.

35 Prep. de la muestra: Se mezclaron muestras 1 + 1 con tampón de muestra x 2 (para purificaciones con grandes cantidades de proteína diana) o 1 volumen de muestra + 1/3 volumen de tampón de muestra x 4 (purificaciones con pequeñas cantidades de proteína diana). (Tampón de muestra x 4 = Tris-HAc 100 mM, pH 7,5, SDS al 2%). Calentamiento a 95°C, durante 3-5 minutos.

40 Aplicación de la muestra: Se usaron trozos de aplicación de la muestra IEF (trozos de papel de filtro de 5x10 mm, 80-1129-46 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Se colocaron hasta 30-32 trozos de papel con sus lados cortos hacia la dirección de funcionamiento. Se aplicaron 20 µl de cóctel de muestra a cada trozo. Se dejaron los trozos en el gel durante la electroforesis completa.

45 Electroforesis: En un aparato Multiphor™ II (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) a 15°C (baño de enfriamiento de circulación). Suministro de Energía EPS 3500. Ajustes limitantes: 600 V, 50 mA, 30 W.

50 Tinción: En Coomassie R350 al 0,1% disuelto en MeOH al 30%, HAc al 10%. Eliminación de la tinción en EtOH al 25%, HAc al 8%.

55 *Cromatografía*: Se empaquetó el medio en columnas HR 5/5 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) a una altura de lecho de 5 cm = 1,0 ml de lecho. Se cargó el medio con Ni²⁺ previamente a su uso bombeando la disolución de sulfato de Ni sobre la columna (5 volúmenes de columna) seguido por agua y por equilibración con tampón de unión (= tampón de IMAC A) con imidazol 5 mM añadido). Se realizó un pequeño barrido de una muestra para ensayo en blanco aplicando tampón de elución, seguido de nuevo por equilibración con tampón de unión.

60 El extracto de *E.coli* con MBP-His, NaCl 1,0 M, imidazol 5 mM y PMSF 1 mM (recién añadido) se clarificó por centrifugación y por filtración a 0,45 um. Después se introdujo el volumen requerido en un Superloop™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) por un filtro de 0,2 um poco antes del inicio de IMAC. Después se aplicaron 3 ml a la columna. Después de un extenso lavado con tampón de unión, se hizo un gradiente lineal de 20 ml (a Tampón de elución al 40% = imidazol 200 mM) usando un sistema Explorer 10 de ÄKTA™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Finalmente, se aplicó una presión de 5 ml con Tampón de elución al 100% (imidazol 500 mM). Todas las 65 etapas fueron a 1,0 ml/min.

ES 2 340 032 T3

Ejemplo 5

Determinación de la capacidad de unión a níquel y filtración de metal a pH 4,0. Capacidad de unión a Níquel

5 La capacidad de unión a níquel (Ni^{2+}) de un medio de separación según la invención se determinó cromatográficamente usando un sistema Explorer 10 AKTA™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) equipado con un detector DAD UV/Vis. Se realizó el ensayo sobre gel al que se había acoplado N, N-bis(carboximetil)+/- homocisteína según la descripción anterior y se empaquetó en columnas HR5/5 de 1 ml (Figura 4). Este resultado se comparó con la densidad del ligando presente en el gel cuando se determina por análisis elemental (análisis de nitrógeno, conteniendo cada
10 ligando un átomo de nitrógeno).

Se consideró que la correlación entre la capacidad de unión a níquel y la densidad del ligando era muy buena, es decir, un ligando soporta un ión metálico. Los resultados típicos se muestran en la Figura 5.

15 *Descripción del método*

Se inyectó una disolución de NiSO_4 para cargar el gel con iones Ni^{2+} . Se retiró el exceso de metal por lavado con agua y tampón de fosfato (PO_4 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4). Los iones níquel unidos al gel se eluyeron con AEDT, que es un quelante muy potente y arrastra eficazmente los iones metálicos del gel. Se midió a 372 nm el área del
20 pico del complejo de Ni-AEDT, coloreado de verde, eluído. Se estableció una curva de calibración lineal a partir de disoluciones con diferentes concentraciones de Ni-AEDT y se usó para cuantificación. La capacidad de unión a níquel (Figura 4, pico 1) se dio como μmoles de Ni/ml de gel empaquetado.

Filtración de metal

25 Se realizó un ensayo de filtración de metal para evaluar la estabilidad del complejo ligando-níquel. Después se lavó el gel cargado de níquel con tampón de acetato, pH 4,0, antes de la determinación del contenido en Ni en el gel (Figura 4).

30 Se consideró que la filtración de metal era muy baja para todos los geles analizados preparados según la presente invención; típicamente la filtración fue del 4%.

Descripción del método

35 Se analizó la filtración de iones níquel de manera análoga a la capacidad de unión a níquel. Sin embargo, antes de la elución de los iones níquel con AEDT, se lavó el gel con diez volúmenes de columna de tampón de acetato, 100 mM, pH 4,0. La filtración se dio como % de la capacidad de unión y se determinó como la diferencia entre la capacidad de unión a níquel y la cantidad eluida después del lavado con pH 4 (Figura 4, pico 2) según la fórmula:
40 $(\text{área}_{\text{Pico2}} - \text{área}_{\text{Pico1}}) / \text{área}_{\text{Pico1}}$.

45

50

55

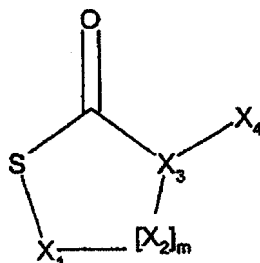
60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para generar al menos un ligando de afinidad quelante de metal, polidentado, método que comprende las etapas de:

(a) proporcionar al menos un armazón definido por la fórmula general (I):



20 en la que X₁, X₂ y X₃ indistintamente unos de otros, son átomos de carbono o heteroátomos con hibridación sp² o sp³.

X₄ es un nucleófilo y

25 m es un número entero de 0-2;

(b) proporcionar al menos un brazo de ligando de afinidad quelante de metal, polidentado, opcionalmente en una forma en la que las funcionalidades quelantes de metales están protegidas, en cada armazón, por derivación de los grupos X₄ nucleofílicos de dichos armazones por adición de un agente de derivación que es un éster protegido halogenado, al tiempo que se mantiene la estructura cíclica del armazón;

(c) abrir el anillo por hidrólisis del enlace entre el carbonilo y el azufre del armazón derivado por adición de una base que adiciona uno o más brazos de ligando de afinidad quelante de metal al armazón y, si se requiere,

35 (d) desproteger las funcionalidades del (de los) brazo(s) de ligando proporcionado(s) en la etapa (b).

2. Un método según la reivindicación 1, en el que en la fórmula (I), X₁, X₂ y X₃ son átomos de carbono.

40 3. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en la fórmula (I), X₄ es -NH₂.

4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en la fórmula (I), m es 1 y el armazón es homocisteína tiolactona.

45 5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la derivación se proporciona por adición de dos agentes de derivación, que comprende dos funcionalidades quelantes de metal diferentes o idénticas.

6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que un agente de derivación es el éster etílico del ácido bromoacético.

50 7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las funcionalidades quelantes de metal están protegidas en la etapa (b) y con posterioridad, se realizan esencialmente simultáneamente la etapa (c) y la etapa (d).

55 8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el las etapas (a) y (b) se han realizado antes de proporcionar un armazón fácilmente derivado.

9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el producto obtenido en la etapa (d) está acoplado mediante su grupo tiol a una matriz de base para producir un medio de separación.

60 10. Un método según la reivindicación 9, en el que el grupo tiol está acoplado a grupos alilo de la matriz de base.

11. Un método según la reivindicación 9 ó 10, que incluye también una etapa de alilación de una matriz de base para proporcionar grupos reactivos.

65 12. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que el grupo tiol del ligando se acopla a la matriz de base mediante el grupo alilo del alil glicidil éter (AGE).

ES 2 340 032 T3

13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, que comprende también una etapa de activación de los grupos reactivos de la matriz de base.

14. Un método según la reivindicación 13, en el que la activación se realiza por bromación.

5

10

15

20

25

30

35

40

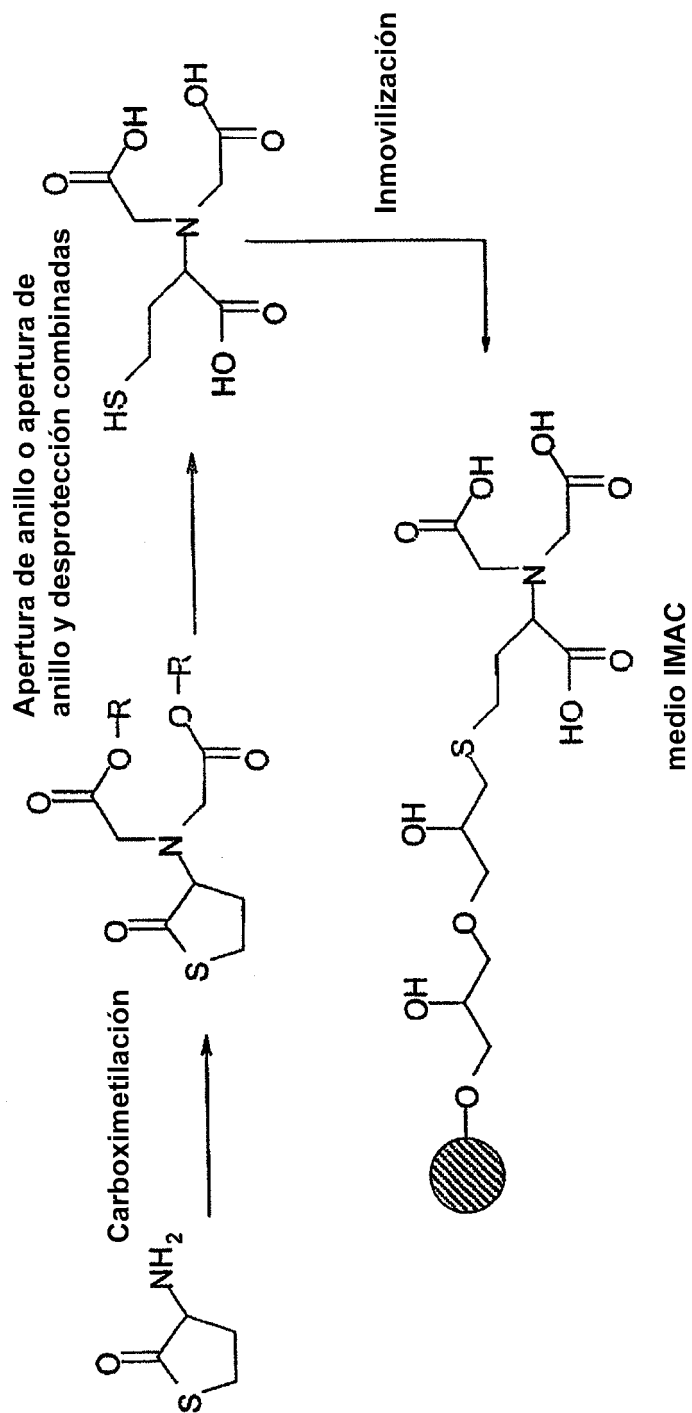
45

50

55

60

65



R = H, Grupo protector lábil a ácido o álcali

FIGURA 1

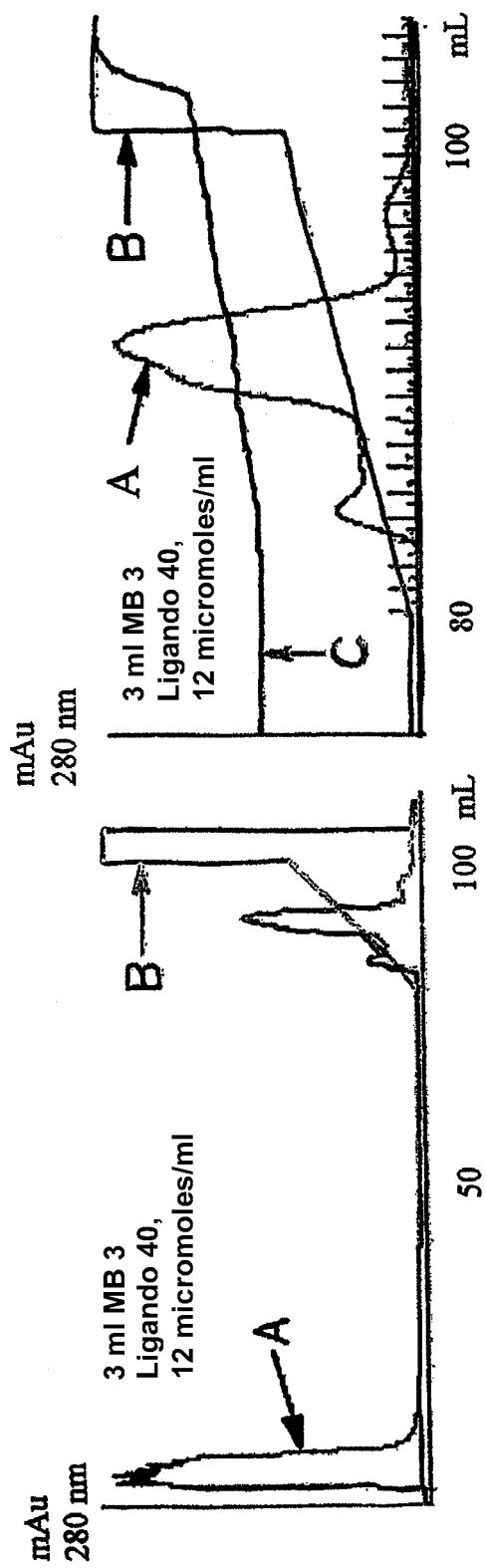


FIGURA 2

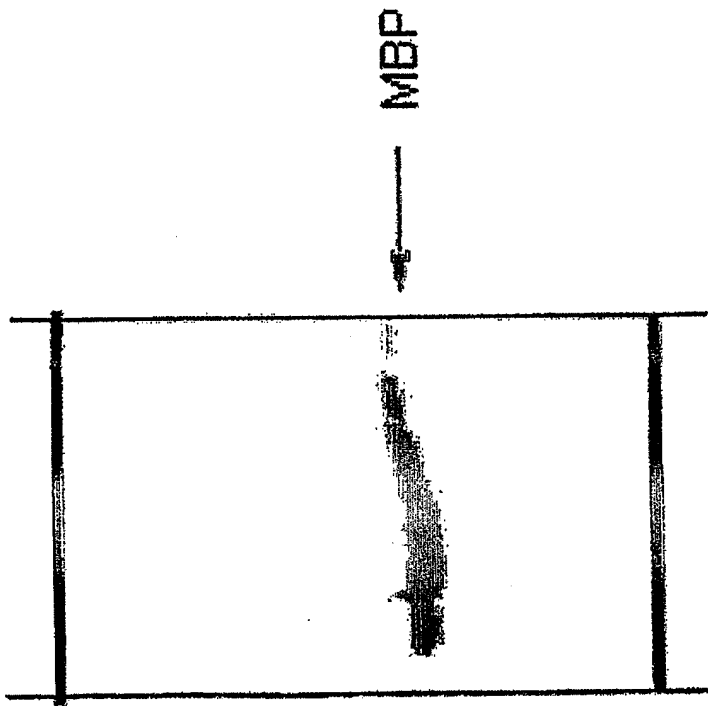


FIGURA 3

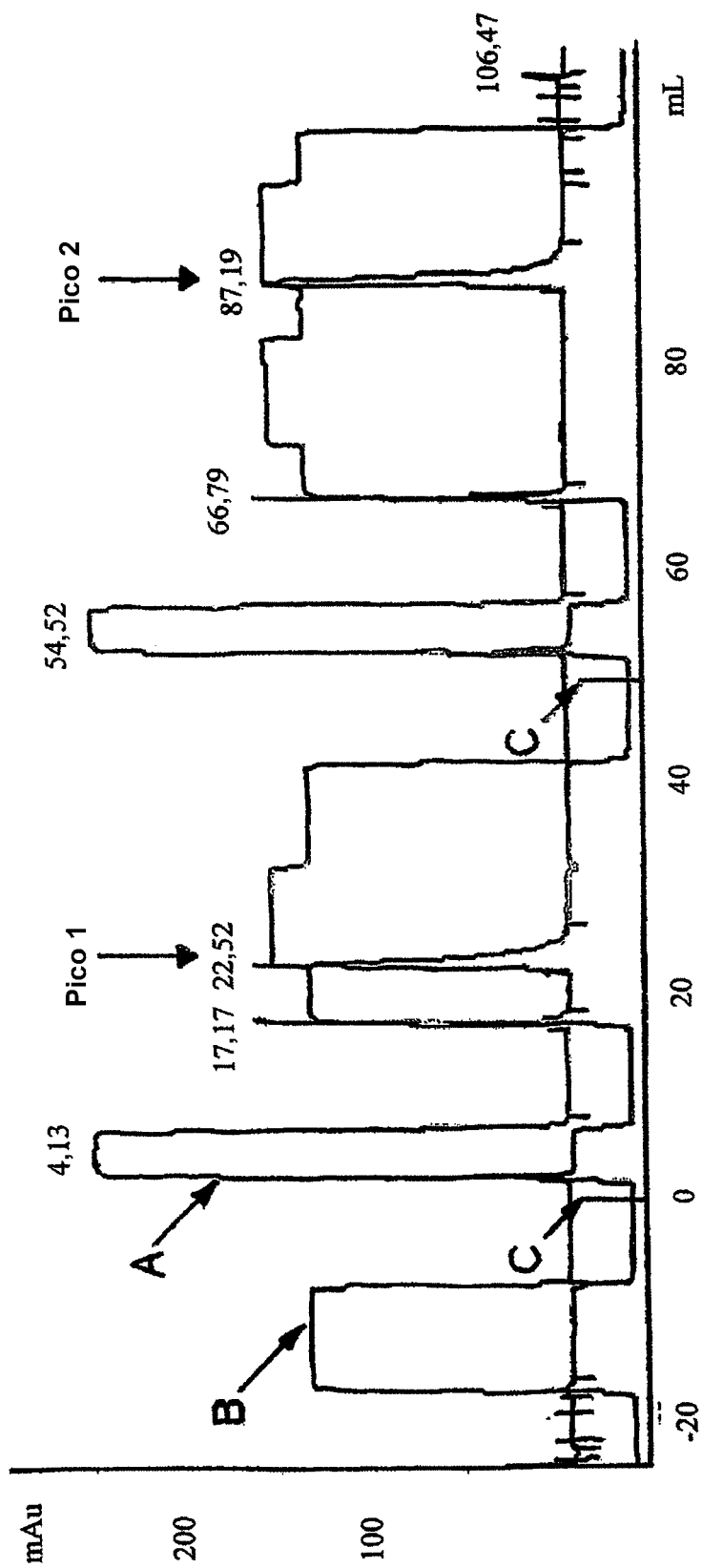


FIGURA 4

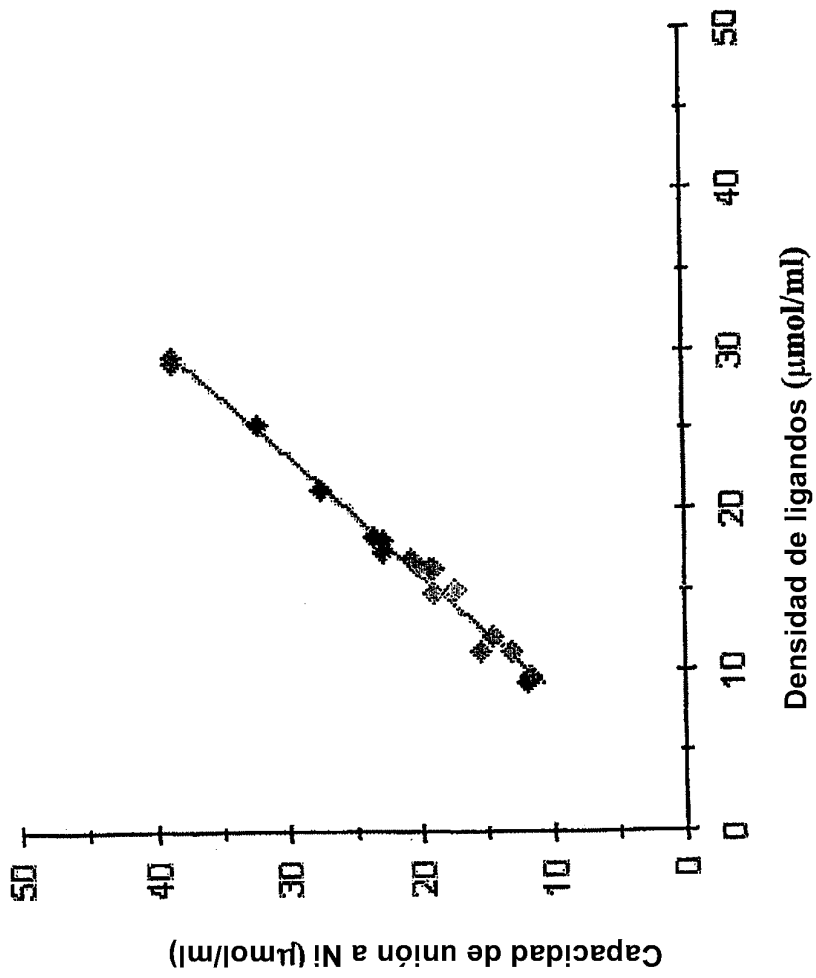


FIGURA 5