



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 699**

51 Int. Cl.:
A61L 2/04 (2006.01)
A61L 2/07 (2006.01)
B01J 20/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08798746 .7**
96 Fecha de presentación : **27.08.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2182990**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2010**

54 Título: **Método de esterilización para un medio de separación cromatográfica.**

30 Prioridad: **30.08.2007 GB 0716900**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.07.2011

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

72 Inventor/es: **Drevin, Ingrid;**
Houshmand, Hamid y
Lind, Ola

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de esterilización para un medio de separación cromatográfica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para la esterilización de diferentes materiales, especialmente materiales sensibles, y en particular medios de cromatografía que tienen ligandos de afinidad unidos a los mismos, tales como ligandos proteínicos.

Antecedentes de la invención

10 La fabricación de productos biofarmacéuticos, particularmente fármacos basados en moléculas bioactivas tales como proteínas, péptidos y ácidos nucleicos, requiere la producción y purificación de estas moléculas en una escala industrial. En particular, la creciente demanda de anticuerpos monoclonales (MAbs) como productos biofarmacéuticos ha promovido el desarrollo de cultivos celulares con altos niveles de expresión y, como consecuencia, la demanda de procedimientos de purificación más eficaces ha aumentado. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales están revolucionando el tratamiento de muchas enfermedades, y se han convertido en uno de los principales indicadores de la dirección en que se están moviendo los tratamientos con fármacos. Las últimas estimaciones del mercado europeo de terapéutica con anticuerpos monoclonales llegan a una cifra de 11,4 billones de dólares (8,7 billones de euros) para 2011. Este aumento de la demanda ha necesitado el uso de sistemas de cromatografía avanzados, grandes, que comprenden columnas rellenas con medios de separación tales como SEPHAROSE™, MABSELECT™, SOURCE™ Y CAPTO™ (GE Healthcare).

20 Durante la separación cromatográfica de productos biofarmacéuticos, es de importancia crítica asegurar que el procedimiento se realiza bajo condiciones estériles y que los contaminantes potencialmente perjudiciales son retirados del sistema antes del uso. La contaminación con bacterias y otros microbios es un problema encontrado a menudo dentro de muchas aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. Diversos agentes son conocidos por su capacidad de inactivar y/o destruir poblaciones microbianas, por ejemplo, hidróxido de sodio, ácido peracético, ácido fosfórico, óxido de etileno, dióxido de cloro y alcohol bencílico. Sin embargo, la desinfección de columnas y medios cromatográficos es engorrosa, particularmente la desinfección de medios proteínicos, es decir, medios cromatográficos provistos de ligandos proteínicos, tales como diversos medios de cromatografía de afinidad. Los desinfectantes y reactivos sanitarios más eficaces, tales como ácidos o álcalis fuertes, compuestos de amonio cuaternario, compuestos que contienen halógenos, agentes oxidantes y fenoles y compuestos relacionados son considerados perjudiciales para la mayoría de los medios de cromatografía, particularmente para medios de afinidad proteínicos. Además, se considera también que los métodos de esterilización, tales como irradiación gamma y tratamiento en autoclave, tienen grandes efectos perjudiciales sobre esos medios.

30 Además, muchos métodos sanitarios o de esterilización que implican ácidos o álcalis, compuestos de amonio cuaternario, compuestos que contienen halógenos, agentes oxidantes y fenoles y compuestos relacionados son nocivos y/o tóxicos. Por tanto, se requieren métodos para la esterilización eficaz del material sensible, tal como los medios cromatográficos.

35 La patente de EE.UU. 5817528 (Böhm, W. et al) describe un método para producir una columna estéril y exenta de pirógenos que contiene un material matriz al que está acoplada una proteína. Adecuadamente, la proteína acoplada a la columna es la Proteína A de *Staphylococcus aureus*, o la Proteína G de *Streptococcus*, o la proteína puede ser un anticuerpo tal como inmunoglobulina anti-LDL humano o inmunoglobulina anti-Ig humana. El método proporciona un material matricial de columna tal como una agarosa que es activada químicamente, usando CNBr/trietilamina o usando 1,1'-carbonildiimidazol. El material matricial de cromatografía es esterilizado preferiblemente por esterilización con vapor a 115°C, antes de combinarlo con una proteína purificada, exenta de patógenos, bajo condiciones asépticas para acoplar la proteína al material matricial.

40 La solicitud de patente internacional WO 2006/096116 describe un método de esterilización de una columna de cromatografía que está rellena con una matriz de separación, haciendo pasar un líquido acuoso supercalentado a través del relleno.

Compendio de la invención

45 La presente invención proporciona un nuevo método de esterilización para la contaminación bacteriana y/o vírica, particularmente en medios de separación cromatográficos usados en la purificación de materiales biofarmacéuticos. Los inventores han encontrado que los medios de separación cromatográficos que tienen ligandos proteínicos particulares como los definidos en la presente memoria y que están unidos a una matriz de soporte sólida son sorprendentemente resistentes a la desnaturalización por esterilización por tratamiento en autoclave.

50 Así, en un primer aspecto, se proporciona un método para la esterilización de un medio de separación cromatográfico, en el que el medio de separación cromatográfico comprende ligandos proteínicos unidos a una matriz de soporte sólida, comprendiendo el método exponer el medio de separación cromatográfico a agua a una temperatura de entre 121°C y 135°C. El medio de separación cromatográfico es expuesto a una presión en el intervalo de 0,2

MPa a 3,5 MPa.

Los ligandos proteínicos adecuados se seleccionan del grupo que consiste en moléculas que se unen a anticuerpos, particularmente análogos funcionales de la Proteína A y la Proteína G. En una realización, el medio de separación cromatográfico comprende una matriz de soporte sólida que tiene ligandos proteínicos unidos a la misma, y en donde el ligando proteínico es un ligando derivado de la Proteína A estabilizado con álcali.

En una realización, el medio de separación cromatográfico es expuesto a agua bajo una presión en el intervalo de 3,0-3,5 MPa, más preferiblemente bajo una presión en el intervalo de 3,4-3,5 MPa.

En una realización, el medio de separación cromatográfico es expuesto a agua durante un periodo de tiempo en el intervalo de 10 a 60 minutos.

En una realización particular, el medio de separación cromatográfico que comprende una matriz de soporte sólida que tiene ligandos proteínicos unidos a la misma es esterilizado por exposición del medio a agua a una temperatura de 121°C y 3,4 MPa durante 12 minutos.

Preferiblemente, el medio de separación cromatográfico a ser esterilizado está contenido en una columna cromatográfica o soportado en un filtro.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra la capacidad de unión a IgG dinámica de una muestra de referencia de MABSELECT, comparada con MABSELECT después de un tratamiento en autoclave a 121°C, 3,44 MPa durante 12 minutos.

La Figura 2 es un gráfico que muestra la capacidad de unión dinámica de una muestra de referencia de MABSELECT SURE, comparada con MABSELECT SURE después de un tratamiento en autoclave a 121°C, 3,44 MPa durante 12 minutos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un nuevo y eficaz método para la esterilización de columnas/medios de cromatografía y filtros, particularmente un medio de separación cromatográfico que tiene ligandos proteínicos unidos al mismo. En particular, la invención se refiere a un método para la inactivación bacteriana y vírica de medios de separación cromatográficos que tienen un ligando derivado de la proteína A estabilizado por álcalis unido a los mismos. El método está basado en una exposición de los medios de separación a agua a una temperatura entre aproximadamente 121°C y aproximadamente 135°C, más particularmente entre aproximadamente 121°C y aproximadamente 123°C. En una realización particularmente preferida, el medio de separación cromatográfico es expuesto a agua a una temperatura de 121°C.

De manera general, la esterilización con calor húmedo por tratamiento en autoclave se refiere al calentamiento de un material en un autoclave (p.ej., un aparato de desplazamiento por gravedad) bajo una presión de al menos 0,2 MPa para alcanzar una temperatura de entre aproximadamente 121°C y aproximadamente 135°C. En el procedimiento de esterilización, los microorganismos son matados por calentamiento en presencia de humedad y presión elevada. Véase, por ejemplo, "Understanding the Operation & Validation of Autoclaves: A Practical Approach", Reeks, B., BDR Publishing (Septiembre de 1999). El periodo de esterilización requerido es dependiente tanto de la temperatura como del tamaño de la muestra a ser esterilizada, y puede estar en el intervalo de 10 a 60 minutos. Según aumentan la temperatura y la presión, el tiempo requerido para conseguir la esterilización completa puede ser reducido normalmente, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Presión (MPa, abs)
121-124	15	0,201
126-129	10	0,240
134-137	3	0,305

Convencionalmente, los medios de cromatografía, en la forma de columnas rellenas, no pueden ser esterilizados por tratamiento en autoclave porque el relleno de la columna puede ser destruido. Por tanto, los medios de cromatografía son normalmente saneados (reducción del número de contaminantes microbianos hasta un nivel aceptable), en lugar de realizar la esterilización completa de los medios. Para ensayar el método para esterilizar el medio de separación cromatográfico descrito en la presente memoria, los inventores han utilizado las elevadas temperaturas y presiones obtenibles con el Sistema de Extracción Acelerada con Disolventes ASE 200 (Dionex Corp) para mantener el agua por debajo de su punto de ebullición. El instrumento ASE 200 puede ser programado en temperatura, tiempo y presión. Dado que el límite de presión más bajo obtenible con el instrumento ASE 200 es ~3,4 MPa, los inventores pudieron evaluar la esterilización con vapor a alta presión realizada a las temperaturas de esterilización normales requeridas, es decir, 121°C.

Como se emplea en la presente memoria, el término "medio de separación cromatográfico" se refiere a una fase estacionaria o en partículas que es eficaz en unirse (es decir, adsorber) a un analito bajo condiciones de la fase móvil seleccionadas, y en liberar el analito bajo otras condiciones de la fase móvil seleccionadas. El procedimiento descrito en la presente memoria es particularmente adecuado para esterilizar medios cromatográficos que contienen ligandos proteínicos unidos a los mismos. Un medio de separación cromatográfico preferido es el MABSELECT SURE™. El MABSELECT SURE (acrónimo en inglés de Resistencia Superior) es un medio de cromatografía descrito en la solicitud de patente internacional WO 03/080655 (Hober, S), y está basado en un ligando derivado de la proteína A estabilizado con álcali, en el que la secuencia de aminoácidos de la proteína ha sido mutada por sustitución de al menos un residuo de asparragina por un aminoácido distinto a la glutamina, en comparación con el ligando proteínico parental. Cuando se emplea en un medio de separación cromatográfico, el ligando proteínico mutado exhibe una capacidad de unión aumentada durante dos o más separaciones con limpieza alcalina intermitente, en comparación con un medio de separación que comprende la molécula proteínica parental. Preferiblemente, el ligando proteínico descrito en la presente memoria es una proteína de unión al fragmento Fc que se puede usar para la unión selectiva de proteínas IgG, IgA y/o IgM, más preferiblemente IgG.

La matriz de soporte sólida del medio de separación acorde con la invención puede ser de cualquier clase bien conocida adecuada. Una matriz de separación de afinidad convencional es a menudo de naturaleza orgánica y basada en polímeros que exponen una superficie hidrófila a los medios acuosos usados, es decir, exponen grupos hidroxilo (-OH), carboxi (-COOH), carboxamido (-CONH₂, opcionalmente en formas sustituidas en N), amino (-NH₂, opcionalmente en forma sustituida), oligo- o polietileno en sus superficies externas, y, si están presentes, también en superficies internas. En una realización, los polímeros pueden estar basados, por ejemplo, en polisacáridos, tales como dextrano, almidón, celulosa, pululano, agarosa, etc., que han sido ventajosamente reticulados, por ejemplo con bis-epóxidos, epihalohidrinatos, hidrocarburos inferiores 1,2,3-trihalo-sustituidos, para proporcionar una porosidad y rigidez adecuadas. En la realización más preferida, el soporte sólido son perlas de agarosa porosas.

Alternativamente, el soporte sólido está basado en polímeros sintéticos, tales como poli(alcohol vinílico), poli(acrilatos de hidroxialquilo), poli(metacrilatos de hidroxialquilo), poli(acrilamidas, polimetacrilamidas, etc. En caso de polímeros hidrófobos, tales como matrices basadas en bencenos sustituidos con divinilo y monovinilo, la superficie de la matriz es a menudo hidrofílica para exponer grupos hidrófilos como los definidos anteriormente a un líquido acuoso circundante.

En aún otra realización alternativa, el soporte sólido puede ser de naturaleza inorgánica, p.ej., sílice, óxido de circonio, etc.

En aún otra realización adicional, el soporte sólido está en otra forma, tal como una superficie, una astilla, capilares, o un filtro.

El ligando se puede adherir al soporte mediante técnicas de acoplamiento convencionales que utilizan, p.ej., grupos amino y/o carboxi presentes en el ligando. Los bis-epóxidos, epiclorohidrina, CNBr, éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), etc. son reactivos de acoplamiento bien conocidos. Se puede introducir un grupo espaciador entre el soporte y el ligando, mejorando de este modo la disponibilidad del ligando y facilitando el acoplamiento químico del ligando al soporte. Alternativamente, el ligando puede ser adherido al soporte mediante una unión no covalente, tal como adsorción física o adsorción bioespecífica.

El método es particularmente adecuado para la esterilización de medios susceptibles a la degradación bajo condiciones duras, tales como MABSELECT SURE™.

El método de esterilización es ampliamente aplicable, y se puede usar para esterilizar medios de cromatografía destinados a cualquier fin, tal como el aislamiento de moléculas bioactivas que incluyen anticuerpos (particularmente anticuerpos monoclonales), ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN genómicos), y para el aislamiento y separación de células de muestras biológicas.

El método de esterilización es adecuado también para columnas y filtros desechables. Las columnas/filtros desechables ofrecen la ventaja de estar listos para el uso sin ninguna necesidad de limpieza y esterilización adicionales. Esto implica columnas/filtros con buena esterilidad o al menos exentos de contaminación microbiana.

Como se emplea en la presente memoria, el término muestra biológica se refiere a una muestra obtenida a partir de

cualquier origen biológico, que incluye muestras de tejido biológico o células obtenidas por recolección *in vivo* o *in situ*, que contienen o se sospecha que contienen ácidos nucleicos o polipéptidos tales como anticuerpos monoclonales.

La invención se ilustra adicionalmente por referencia al siguiente ejemplo y figuras, en los que:

5 Ejemplo

1. Esterilización por calor húmedo (vapor)

10 Se sometieron medios MABSELECT y MABSELECT SURE a esterilización por calor húmedo (tratamiento en autoclave) bajo una presión de 3,44 MPa y una temperatura de 121°C durante 12 minutos. Para este fin, se introdujeron 33 ml de gel como relleno en una columna de un Extractor Acelerado con Disolventes (ASE 200) de Dionex, EE. UU., con una disolución de NaCl 0,1 M, y se expusieron a 121°C y 3,44 MPa durante 12 minutos. El ASE 200 es un instrumento de alta presión que ofrece presión y calor programables, con una presión mínima a 3,44 MPa.

15 La capacidad de unión a IgG de los geles expuestos de medios MABSELECT y MABSELECT SURE se midió en comparación con los geles sin tratar. Los datos de capacidad de unión dinámica para los medios sin tratar (columnas de referencia 1-4) y tratados con autoclave se muestran en las Tablas 2 y 3. EL $DBC_{n\%}$ es la capacidad de unión dinámica medida a un progreso de n %.

Tabla 2: MABSELECT

	<u>Columna de referencia 1</u> (mg/ml de medio)	<u>Columna de referencia 2</u> (mg/ml de medio)	<u>Columna de referencia 3</u> (mg/ml de medio)	<u>Columna de referencia 4</u> (mg/ml de medio)	<u>Medio tratado en autoclave</u> (mg/ml de medio)
DBC _{5%}	7,2	5,7	7,8	7,6	3,0
DBC _{10%}	11,1	10,6	12,3	11,9	6,3
DBC _{50%}	47,2	30,9	31,4	30,6	17,2

20

Tabla 3: MABSELECT SURE

	<u>Columna de referencia 1</u> (mg/ml de medio)	<u>Columna de referencia 2</u> (mg/ml de medio)	<u>Medio tratado en autoclave</u> (mg/ml de medio)
DBC _{5%}	9,7	2,2	4,7
DBC _{10%}	13,9	6,5	9,3
DBC _{50%}	30,1	27,3	30,4

25

Los resultados demuestran que la esterilización por calor húmedo acorde con el método descrito en la presente memoria no tuvo efecto sobre la capacidad de unión del MABSELECT SURE. Por el contrario, el MABSELECT perdió el 45% de su capacidad de unión a IgG después de la esterilización por calor húmedo bajo las mismas condiciones.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es solamente para la conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado en compilar las referencias, no se pueden excluir los errores u omisiones, y la EPO declina toda responsabilidad a este respecto.

5 Documentos de patente citados en la descripción

- Patente de EE.UU. 5817528 A, Böhm, W.
- Solicitud de patente internacional WO 2006096116 A
- Solicitud de patente internacional WO 03080655 A, Hober, S.

Bibliografía no relacionada con patentes citada en la descripción

- 10 • **Reeks, B.** "Understanding the Operation & Validation of Autoclaves: A Practical Approach". BDR Publishing (Septiembre de 1999)

REIVINDICACIONES

1. Un método para la esterilización de un medio de separación cromatográfico, comprendiendo el método exponer el medio de separación cromatográfico a agua a una temperatura de entre 121°C y 135°C bajo una presión en el intervalo de 0,2 MPa a 3,5 MPa,
5 **caracterizado porque** el medio de separación cromatográfico comprende ligandos proteínicos unidos a una matriz de soporte sólida.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho medio de separación cromatográfico es expuesto a agua bajo una presión en el intervalo de 3,0-3,5 MPa.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho medio de separación cromatográfico es expuesto a agua bajo una presión en el intervalo de 3,4-3,5 MPa.
10
4. El método según la reivindicación 1, en el que dicho medio de separación cromatográfico es expuesto a agua durante un período de tiempo en el intervalo de 10 a 60 minutos.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho medio cromatográfico es expuesto a agua bajo una presión de 3,44 MPa y a una temperatura de 121°C.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que dicho medio de separación cromatográfico a ser esterilizado está contenido en una columna de cromatografía o soportado en un filtro.
15
7. El método según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos de dichos ligandos proteínicos ha sido mutada por sustitución de al menos un residuo de asparragina por un aminoácido distinto de la glutamina, en comparación con el ligando proteínico parental.
8. El método según la reivindicación 1, en el que dichos ligandos proteínicos son proteínas de unión al fragmento Fc.
20
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el medio de separación cromatográfico a ser esterilizado es un ligando derivado de la proteína A estabilizado con álcali unido a una matriz de soporte.

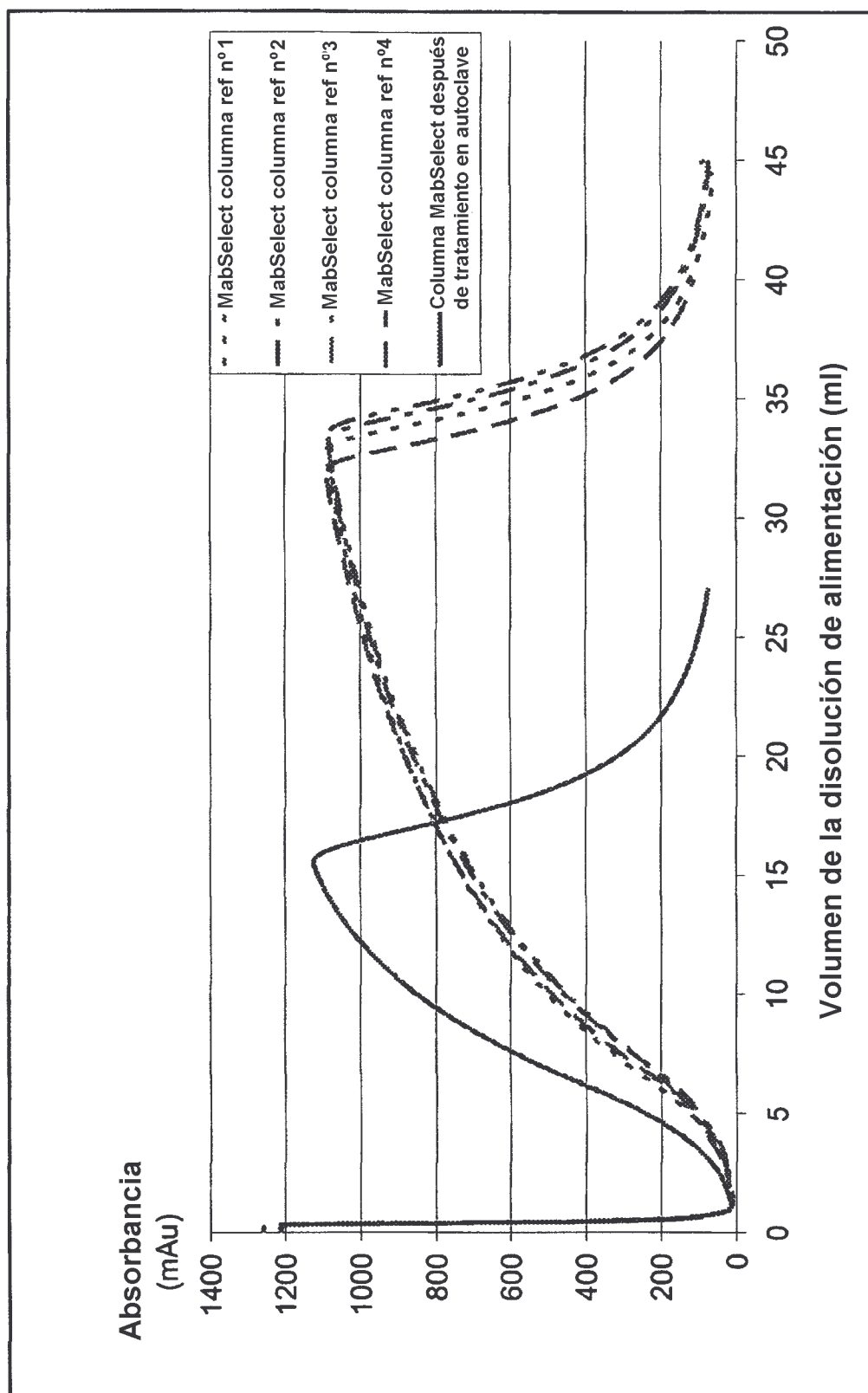


Figura 1

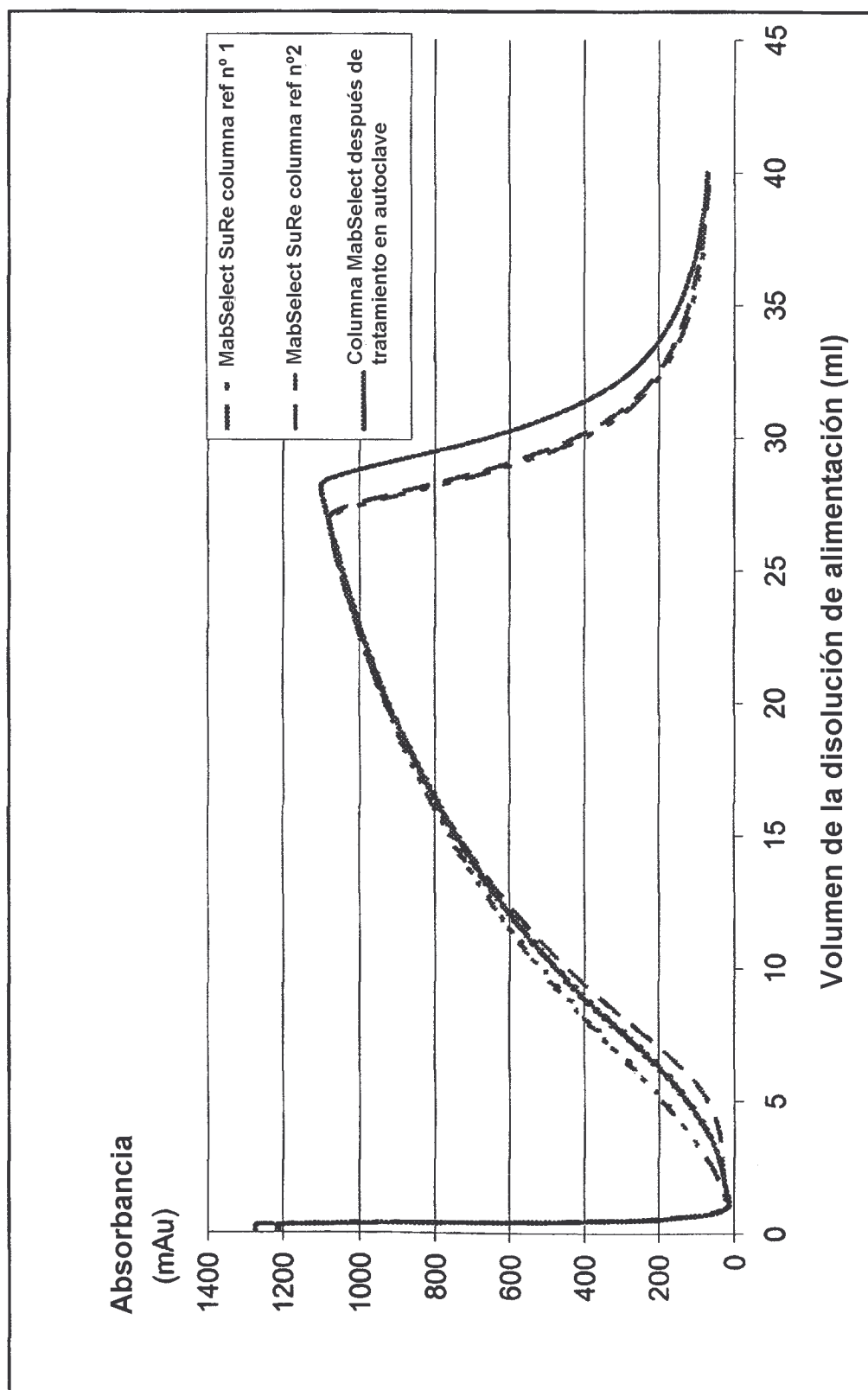


Figura 2