

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 931**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09736315 .4**
96 Fecha de presentación: **15.09.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2335076**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2011**

54 Título: **Procedimientos para cuantificar la filtración de proteína desde resinas de cromatografía de afinidad basada en proteína**

30 Prioridad:
15.09.2008 US 192082 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.12.2012

73 Titular/es:
EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
290 Concord Road
Billerica, MA 01821, US

72 Inventor/es:
BIAN, NANYING

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 391 931 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

Procedimientos para cuantificar la filtración de proteína desde resinas de cromatografía de afinidad basada en proteína

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a procedimientos para cuantificar la filtración de proteína desde resinas de cromatografía de afinidad basada en proteína seleccionadas entre resinas de cromatografía de afinidad basada en proteína A, proteína G y proteína L.

Antecedentes

- 10 La cromatografía de afinidad basada en proteína se ha usado ampliamente en la purificación de proteínas, ADN, y otras moléculas químicas y biológicas a diversas escalas, variando de escala de laboratorio, piloto a producción. Véase, por ejemplo, Hermanson y col., Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press, Inc. San Diego, CA, págs. 317-34b (1992). Entre ellas, las resinas de cromatografía de afinidad basada en proteína A (PrA), proteína G (PrG) y proteína L (PrL) son bien conocidas y ampliamente usadas en procedimientos para la detección y/o purificación de inmunoglobulinas (Ig), sin embargo, cada una tiene diferentes especificidades con respecto a la unión de Ig.

- 15 Como un ejemplo, reactivos basados en PrA han encontrado especialmente un uso extendido en el campo de la biotecnología, por ejemplo, la cromatografía de afinidad para la captura y purificación de anticuerpos así como en procedimientos de detección de anticuerpos. Actualmente, los medios o resinas de afinidad basados en PrA probablemente son los medios de afinidad más ampliamente usados para el aislamiento de anticuerpos monoclonales y sus fragmentos a partir de diferentes muestras incluyendo cultivo celular. Por consiguiente, diversas matrices que comprenden ligandos de proteína A están disponibles en el mercado incluyendo, por ejemplo, ProSep®-vA High Capacity, ProSep® vA Ultra y ProSep® UltraPlus (Millipore) y Protein A Sepharose™, rmp Protein A Sepharose Fast Flow, MabSelect™, MabSelect Xtra™ y MabSelect SuRe® (GE Healthcare), Poros MabCapture A (Applied Biosystems) y Sartobind Protein A (Sartorius).

Sumario de la invención

- 25 Aunque son altamente deseables resinas de cromatografía de afinidad basada en proteína, por ejemplo, resinas de cromatografía de afinidad basada en proteína A, G y L, para la purificación de analitos o moléculas que se unen a las mismas, por ejemplo, inmunoglobulinas (Ig) en el caso de PrA, PrG y PrL, un inconveniente es la filtración de la proteína, por ejemplo, proteína A, G o L, de la columna de cromatografía junto con el analito o molécula de interés, por ejemplo, una inmunoglobulina. Por ejemplo, la cromatografía de afinidad basada en proteína A es altamente deseable para la purificación a gran escala de anticuerpos, por ejemplo, a causa de su capacidad de unirse específicamente a anticuerpos con elevada capacidad y para conseguir elevada pureza, sin embargo, la PrA lixiviada, a causa de su propia actividad biológica y perfil toxicológico, habitualmente se considera una impureza indeseable en un eluato de inmunoglobulina. Por consiguiente, en algunos aspectos de la presente invención, es deseable controlar la filtración de PrA y eliminarla finalmente en etapas de cromatografía posteriores. Por ejemplo, un modo de minimizar la filtración de PrA es usar resinas de PrA que muestren la cantidad más baja de filtración de PrA desde una columna de cromatografía. Por consiguiente, en algunos aspectos, los procedimientos de la presente invención pueden usarse para identificar resinas de cromatografía de afinidad basada en proteína incluyendo, aunque sin limitación, resinas de cromatografía de afinidad basada en PrA, PrG y PrL, que muestren la cantidad más baja de filtración desde la columna de cromatografía. Dichas resinas de cromatografía de afinidad basada en proteína incluyen resinas conocidas así como aquellas que pueden desarrollarse en el futuro.

- 30 Se han desarrollado varios ensayos de exploración basados en Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA del inglés Enzyme-Linked Immunosorbant Assay) para detectar la filtración de PrA desde columnas de cromatografía. Sin embargo, la mayoría de estos ensayos son de naturaleza cualitativa y generalmente muestran una mayor variabilidad (por ejemplo, $\geq 25\%$) para ser adecuados como herramienta analítica, por ejemplo, para proporcionar una comparación de las resinas de cromatografía de afinidad basada en PrA, identificar resinas que muestren la cantidad más baja de filtración de PrA y para controlar la PrA lixiviada en combinaciones de elución de anticuerpos después de la cromatografía de afinidad y las posteriores etapas de cromatografía.

- 35 Se han usado ampliamente marcas fluorescentes en investigación bioquímica y química a causa de su elevada sensibilidad y selectividad asociada con dichas marcas. Por ejemplo, la proteína A lixiviada de resinas de afinidad se ha detectado previamente usando colorantes fluorescentes, sin embargo, dichos colorantes se han usado principalmente para generar información cualitativa, por ejemplo, detección, y no para proporcionar ninguna información cuantitativa, por ejemplo, la cantidad de PrA lixiviada. Véase, por ejemplo, Carter-Franklin, y col., Journal of Chromatography A, 1163: 105-111 (2007).

- 40 La presente invención se refiere, al menos en parte, a procedimientos cuantitativos para detectar la filtración de proteína, por ejemplo, PrA, desde medios o resinas de cromatografía usando, por ejemplo, marcas fluorescentes. Los procedimientos de acuerdo con la invención muestran una variabilidad de menos del 10% y son especialmente

adecuados para identificar resinas de cromatografía PrA que muestren la cantidad más baja de filtración de PrA.

En un aspecto de acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para cuantificar la filtración de PrA desde una resina de cromatografía de afinidad basada en PrA, donde el procedimiento comprende las etapas de: (a) marcar la resina de cromatografía basada en PrA, con una o más marcas fluorescentes; (b) dividir la resina marcada en una primera y segunda partes iguales; (c) tratar la primera parte con un medio adecuado para liberar la PrA marcada de la resina y añadir una cantidad en exceso de Ig a la segunda parte; (d) medir la fluorescencia (FL_{digest}) y la concentración de PrA ($[PrA]$) de la resina tratada en la primera parte de la etapa (c); y (e) medir la concentración de elución de Ig de la resina ($[Ig]$) y la señal de fluorescencia en un eluato de Ig (FL_{Ig}) de la segunda parte de la etapa (c), donde la filtración de PrA se cuantifica calculando $\{(FL_{Ig})/((FL_{digest})/[PrA])\}/[Ig]$.

En otro aspecto de acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para cuantificar la filtración de PrA desde una resina de cromatografía de afinidad basada en PrA, donde el procedimiento comprende las etapas de: (a) marcar la resina de cromatografía basada en PrA con una o más marcas fluorescentes; (b) añadir una cantidad en exceso de Ig a la resina marcada y medir la concentración de elución de Ig de la resina ($[Ig]$) y la señal de fluorescencia en el eluato de Ig (FL_{Ig}) de la resina; (c) retirar la Ig residual de la resina seguido del tratamiento de la resina con un medio adecuado para liberar la PrA marcada de la resina; y (d) medir la fluorescencia (FL_{digest}) y la concentración de PrA ($[PrA]$) de la resina tratada, donde la filtración de PrA se cuantifica calculando $\{(FL_{Ig})/((FL_{digest})/[PrA])\}/[Ig]$.

En algunas realizaciones, los procedimientos de la invención se usan para cuantificar la filtración de proteína G (PrG) desde una resina de cromatografía de afinidad basada en PrG.

Por consiguiente, en otro aspecto más de acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para cuantificar la filtración de PrG desde una resina de cromatografía de afinidad basada en PrG, que comprende las etapas de: (a) marcar la resina de cromatografía basada en PrG con una o más marcas fluorescentes; (b) dividir la resina marcada en una primera y segunda partes iguales; (c) tratar la primera parte con un medio adecuado para liberar la PrG marcada de la resina y añadir una cantidad en exceso de Ig a la segunda parte; (d) medir la fluorescencia (FL_{digest}) y la concentración de PrG ($[PrG]$) de la resina tratada en la primera parte de la etapa (c); y (e) medir la concentración de elución de Ig de la resina ($[Ig]$) y la señal de fluorescencia en un eluato de Ig (FL_{Ig}) de la segunda parte de la etapa (c), donde la filtración de PrG se cuantifica calculando $\{(FL_{Ig})/((FL_{digest})/[PrG])\}/[Ig]$.

En otro aspecto más, un procedimiento para cuantificar la filtración de PrG desde una resina de cromatografía de afinidad basada en PrG, comprende las etapas de: (a) marcar la resina de cromatografía basada en PrG con una o más marcas fluorescentes; (b) añadir una cantidad en exceso de Ig a la resina marcada y medir la concentración de elución de Ig de la resina ($[Ig]$) y la señal de fluorescencia en el eluato de Ig (FL_{Ig}) de la resina; (c) retirar la Ig residual de la resina seguido del tratamiento de la resina con un medio adecuado para liberar la PrG marcada de la resina; y (d) medir la fluorescencia (FL_{digest}) y la concentración de PrG ($[PrG]$) de la resina tratada, donde la filtración de PrG se cuantifica calculando $\{(FL_{Ig})/((FL_{digest})/[PrG])\}/[Ig]$.

En realizaciones adicionales más, se usan procedimientos de la invención para cuantificar la filtración de proteína L (PrL) desde una resina de cromatografía de afinidad basada en PrL.

Por consiguiente, en otro aspecto más de acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para cuantificar la filtración de PrL desde una resina de cromatografía de afinidad basada en PrL, que comprende las etapas de: (a) marcar la resina de cromatografía basada en PrL con una o más marcas fluorescentes; (b) dividir la resina marcada en una primera y segunda partes iguales; (c) tratar la primera parte con un medio adecuado para liberar la PrL marcada de la resina y añadir una cantidad en exceso de Ig a la segunda parte; (d) medir la fluorescencia (FL_{digest}) y la concentración de PrL ($[PrL]$) de la resina tratada en la primera parte de la etapa (c); y (e) medir la concentración de elución de Ig de la resina ($[Ig]$) y la señal de fluorescencia en un eluato de Ig (FL_{Ig}) de la segunda parte de la etapa (c), donde la filtración de PrL se cuantifica calculando $\{(FL_{Ig})/((FL_{digest})/[PrL])\}/[Ig]$.

En otro aspecto, un procedimiento para cuantificar la filtración de PrL desde una resina de cromatografía de afinidad basada en PrL, comprende las etapas de: (a) marcar la resina de cromatografía basada en PrL con una o más marcas fluorescentes; (b) añadir una cantidad en exceso de Ig a la resina marcada y medir la concentración de elución de Ig de la resina ($[Ig]$) y la señal de fluorescencia en el eluato de Ig (FL_{Ig}) de la resina; (c) retirar la Ig residual de la resina seguido del tratamiento de la resina con un medio adecuado para liberar la PrL marcada de la resina; y (d) medir la fluorescencia (FL_{digest}) y la concentración de PrL ($[PrL]$) de la resina tratada, donde la filtración de PrL se cuantifica calculando $\{(FL_{Ig})/((FL_{digest})/[PrL])\}/[Ig]$.

Adicionalmente, sin el deseo de limitarse por la teoría, se contempla que los procedimientos de la invención pueden usarse para cuantificar la filtración de cualquier proteína y/o fragmentos de la misma a partir de un procedimiento de cromatografía de afinidad basado en proteína usado para aislar o retirar de una mezcla un analito o molécula que se une a la proteína.

Se proporciona en este documento una descripción de un procedimiento para cuantificar la filtración de proteína desde una resina de cromatografía de afinidad basada en proteína, donde el procedimiento comprende las etapas de: (a) marcar la resina de cromatografía basada en proteína con una o más marcas fluorescentes; (b) dividir la

resina marcada en una primera y segunda partes iguales; (c) tratar la primera parte con un medio adecuado para liberar la proteína marcada de la resina y añadir una cantidad en exceso de un analito que se une a la proteína a la segunda parte; (d) medir la fluorescencia (FL_{digest}) y la concentración de proteína ($[Pr]$) de la resina tratada en la primera parte de la etapa (c); y (e) medir la concentración de elución del analito de la resina ($[analito]$) y la señal de fluorescencia en un eluato de analito ($FL_{analito}$) de la segunda parte de la etapa (c), donde la filtración de Pr se cuantifica calculando $\{(FL_{analito})/((FL_{digest})/[Pr])\}/[analito]$.

Se proporciona también en este documento una descripción de un procedimiento para cuantificar la filtración de proteína desde una resina de cromatografía de afinidad basada en proteína, donde el procedimiento comprende las etapas de: (a) marcar la resina de cromatografía basada en proteína con una o más marcas fluorescentes; (b) añadir una cantidad en exceso de analito a la resina marcada y medir la concentración de elución del analito de la resina ($[analito]$) y la señal de fluorescencia en el eluato de analito ($FL_{analito}$) de la resina; (c) retirar el analito residual de la resina seguido del tratamiento de la resina con un medio adecuado para liberar la proteína marcada de la resina; y (d) medir la fluorescencia (FL_{digest}) y la concentración de proteína ($[Pr]$) de la resina tratada, donde la filtración de Pr se cuantifica calculando $\{(FL_{analito})/((FL_{digest})/[Pr])\}/[analito]$.

En diversas realizaciones, los procedimientos de la invención pueden incluir adicionalmente la etapa de retirar la proteína filtrada, por ejemplo, PrA, PrG o PrL, usando una o más de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio hidrófobo, cromatografía de reparto débil, cromatografía con hidroxapatita, o combinaciones de las mismas. Formatos de cromatografía ejemplares incluyen, aunque sin limitación, columna compactada y un formato de dispositivo de membrana.

En diversas realizaciones de los procedimientos de la invención, se selecciona una marca fluorescente entre el grupo compuesto por Alexa Fluor 488™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), Dylight 488™ (ThermoFisher, Waltham, MA), HiLyte Fluor™ 488, 5-FAM™, SE y 6-FAM™, SE (Anaspec, San Jose, CA).

En diversas realizaciones, el medio adecuado para liberar la proteína marcada de la resina, por ejemplo, PrA, PrG y PrL, usado en los procedimientos de la invención incluye tratamiento químico o tratamiento enzimático. Tratamientos enzimáticos ejemplares incluyen el uso de una enzima que digiere la proteína, por ejemplo, PrA, PrG o PrL, incluyendo, aunque sin limitación, por ejemplo, tripsina, pepsina, quimotripsina, termolisina y subtilisina. Tratamientos químicos ejemplares incluyen el uso de un ácido o base adecuado.

En diversas realizaciones de los procedimientos de la invención, se comparan resinas de cromatografía de afinidad basada en PrA disponibles en el mercado usando los procedimientos de la invención, para identificar aquellas que muestran la cantidad más baja de filtración de PrA. Resinas ejemplares incluyen, aunque sin limitación, ProSep®-vA High Capacity, ProSep® vA Ultra y ProSep® UltraPlus (Millipore); Protein A Sepharose™, MabSelect™, MabSelect Xtra™ y MabSelect SuRe® (GE Healthcare); Sartobind Protein A (Sartorius); y POROS® MabCapture™ A (Applied Biosystems).

En algunos de los procedimientos de la invención, puede retirarse la Ig residual (por ejemplo, IgG) de la resina usando técnicas bien conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, el uso de guanidinio HCl 6 M o urea 4-8 M.

En algunos aspectos de los procedimientos de la invención, una cantidad en exceso de un analito o molécula (por ejemplo, Ig) es una cantidad al menos 2-5 veces mayor que la capacidad de unión máxima de la resina o medio de cromatografía de afinidad basada en proteína usado para aislar o retirar el analito o molécula. En algunas realizaciones, el analito o molécula es una Ig (por ejemplo, IgG) que se une al medio o resina de cromatografía de afinidad basada en PrA, donde una cantidad en exceso de la Ig (por ejemplo, IgG) es al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o más de 5 veces la capacidad de unión de la resina. En general, la cantidad en exceso del analito o molécula (por ejemplo, Ig) puede determinarse en base a la capacidad de unión máxima de la resina típicamente proporcionada por el fabricante de la resina o puede calcularla fácilmente un especialista en la técnica en base a técnicas bien conocidas en la técnica.

La fluorescencia puede medirse usando cualquier medio adecuado incluyendo, aunque sin limitación, el uso de un fluorómetro. La carga de muestra para la detección usando un fluorómetro podría ser en una cubeta o un formato de placa de pocillos.

En diversas realizaciones de los procedimientos de la invención, la Ig (por ejemplo, IgG) puede eluirse usando cualquier medio adecuado tal como, por ejemplo, el uso de un pH adecuado. En una realización ejemplar, un pH adecuado usado para la elución de IgG es un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 4,0. En una realización particular, se usa glicina a pH 2,0 para la elución de IgG.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa un esquema de un procedimiento ejemplar de acuerdo con la invención, en el que se marca PrA con colorante fluorescente (Alexa Fluor™ 488). En resumen, como se representa en la Fig. 1, el medio marcado se divide en dos fracciones de 1 ml. Una fracción se trata enzimáticamente con tripsina. Se obtiene la proporción $FL_{digest}/[PrA]$ leyendo el sobrenadante a UV₂₇₅ nm en un espectrofotómetro UV/Vis a una emisión de 519 nm en un fluorómetro con excitación a 495 nm. La otra fracción se expone a Ig (por ejemplo, IgG) con aproximadamente 5

veces la capacidad estimada del medio, que constituye una cantidad en exceso de IgG. Una vez se ha retirado por lavado el exceso de IgG con PBS (tampón salino fosfato 10 mM), se eluye la IgG unida al medio PrA con glicina 0,1 M pH 2. Después de mezcla suave, se analiza la elución de IgG en un espectrofotómetro UV/Vis a UV_{280} nm ($[IgG]$) y emisión a 519 nm en un fluorómetro con excitación a 495 nm (FL_{IgG}).

- 5 La Fig. 2 representa un gráfico que demuestra que la unión estática de IgG de PrA marcada (por ejemplo, con Alexa Fluor 488) y no marcada es equivalente. En resumen, se ensayaron una resina tipo A marcada de forma fluorescente (FL-A-1 a FL-A-5) y resina no marcada (A-1 a A-3) del mismo lote para su capacidad de unión estática a IgG en tres días diferentes. Los resultados, representados en el gráfico de la Fig. 2, demuestran que las resinas de cromatografía de afinidad basada en PrA tipo A marcadas y no marcadas tienen valores de capacidad de unión estática equivalentes. Se realizó el mismo experimento con una resina tipo B de cromatografía de afinidad basada en PrA diferente, representado por FL-B-1 a FL-B-4 para resina marcada y B-1 a B-3 para resina no marcada. De nuevo, como se demuestra por el gráfico de la Fig. 2, las resinas tipo B tanto marcadas como no marcadas muestran valores de capacidad de unión estática a IgG equivalentes. Por consiguiente, el marcaje con fluorescencia presenta interferencia mínima en una interacción de afinidad PrA-IgG para diferentes resinas. Los resultados también se resumen en la Tabla de la Fig. 2. La capacidad de unión estática de resinas (Qs) de resina tipo A marcada y no marcada (Medio A) se muestran en el lado de la izquierda de la Tabla y lo mismo para la resina tipo B marcada y no marcada (Medio B) se muestra en el lado derecho de la Tabla. También se presentan la desviación típica (DT) y el coeficiente de la varianza (CV). La variabilidad de ensayo para el Medio A marcado y no marcado (4% frente a 3%) así como para el Medio B (7% frente a 6%) es comparable.
- 10
- 15
- 20 La Fig. 3 representa una Tabla que resume los valores de filtración de PrA de cinco lotes diferentes de una resina de afinidad por proteína basada en sílice, cada una ensayada con dos lotes diferentes de Alexa Fluor 488. Como se representa en la Tabla, se consigue una variabilidad de menos del 8,4% para las dos series de experimentos usando dos lotes diferentes del colorante fluorescente.

Descripción detallada de la invención

- 25 La presente invención se refiere a procedimientos para cuantificar la filtración de proteína, por ejemplo, PrA, PrG o PrL de un medio o resina de cromatografía de afinidad basada en proteína, por ejemplo, medio o resina de cromatografía de afinidad basada en PrA, PrG y PrL. Sin el deseo de limitarse por la teoría, se contempla que los procedimientos de acuerdo con la invención pueden usarse para cuantificar la filtración de cualquier proteína desde un medio o resina de cromatografía basada en proteína, donde la proteína se usa para aislar o retirar una molécula que se une a la proteína, incluyendo, aunque sin limitación, por ejemplo, proteína A, proteína G y proteína L que se unen a Ig.
- 30

Para que la presente descripción pueda entenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Definiciones adicionales se exponen durante toda la descripción detallada.

I. Definiciones

- 35 Como se usa en este documento, la expresión "proteína A" o "PrA" abarca proteína A recuperada de una fuente nativa, por ejemplo, de la bacteria *Staphylococcus aureus*, proteína A producida sintéticamente (por ejemplo, por síntesis peptídica o por técnicas recombinantes), incluyendo variantes o derivados de la misma que retienen la capacidad de unirse a proteínas que tienen una región C_{H2}/C_{H3} tales como, por ejemplo, inmunoglobulinas. Fuentes comerciales de PrA incluyen Repligen, GE Healthcare, Fersenius Medical, y Fermatech.
- 40 El término "cromatografía", como se usa en este documento, se refiere a cualquier tipo de técnica de purificación que separe el analito (por ejemplo, una inmunoglobulina o Ig) de interés de otras moléculas en la mezcla, por ejemplo, por sus diferencias en el reparto entre un sustrato sólido y la fase móvil, incluyendo aunque sin limitación, solución, tampón o disolvente y permite que el analito de interés se aísle.
- 45 Como se usa en este documento, la expresión "cromatografía de afinidad", "separación de afinidad", o "purificación de afinidad", como se usan en este documento, se refiere a cualquier técnica de purificación o ensayo que implica la adición de una muestra que contiene un analito o molécula diana (por ejemplo, una inmunoglobulina o Ig) a un soporte sólido que porta en el mismo una proteína que se une al analito, por ejemplo, PrA, PrG y PrL. Después de la unión de un analito o molécula diana (por ejemplo, una Ig) a la proteína (por ejemplo, PrA) y el flujo continuo de las impurezas indeseadas, el analito o molécula diana puede eluirse usando medios adecuados. Por ejemplo, el analito, tal como una IgG, puede recuperarse usando un tampón de elución adecuado que tiene un pH adecuado, por ejemplo, un pH en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, o en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 4. Ejemplos de tampones de elución para este propósito incluyen tampones citrato, glicina, o acetato.
- 50
- 55 La expresión "cromatografía de afinidad basada en PrA" o "cromatografía de afinidad basada en proteína A", como se usa en este documento, se refiere a la separación o purificación de sustancias y/o moléculas, tales como inmunoglobulinas, usando proteína A o un derivado o variante de la misma, donde la PrA generalmente se inmoviliza en un soporte sólido.

La expresión "cromatografía de afinidad basada en PrG" o "cromatografía de afinidad basada en proteína G", como se usa en este documento, se refiere a la separación o purificación de sustancias y/o moléculas, tales como inmunoglobulinas, usando proteína G o un derivado o variante de la misma, donde la PrG generalmente se inmoviliza en un soporte sólido.

- 5 La expresión "cromatografía de afinidad basada en PrL" o "cromatografía de afinidad basada en proteína L", como se usa en este documento, se refiere a la separación o purificación de sustancias y/o moléculas, tales como inmunoglobulinas, usando proteína L o un derivado o variante de la misma, donde la PrL generalmente se inmoviliza en un soporte sólido.

- 10 La expresión "fase sólida" o "soporte sólido" generalmente se refiere a una matriz no acuosa a la que la proteína usada para aislar o retirar un analito o molécula de interés, por ejemplo, proteína A (PrA), proteína G (PrG) o proteína L (PrL) puede adherirse o unirse covalentemente. Por ejemplo, la PrA puede acoplarse a una diversidad de materiales tales como, por ejemplo, agarosas, polisacáridos, dextranos, geles de sílice, polímeros sintéticos (poliestireno-divinilbenzeno, poliacrilato, polimetacrilato, poliacrilamida, alcohol polivinílico, polisulfona, policarbonato, éter polivinílico y sus copolímeros correspondientes) y perlas de vidrio. El formato de soporte sólido incluye, aunque sin limitación, una columna de purificación, fase discontinua de partículas concretas, columna de lecho compactado, y columna de lecho expandido, membrana, etc. En algunas realizaciones, como etapa preliminar opcional, la fase sólida para la cromatografía de afinidad de proteína A puede equilibrarse con un tampón adecuado antes de la cromatografía de la proteína de interés. Un tampón de equilibrado ejemplar contiene tampón salino fosfato 10 mM pH 7,4.

- 20 La expresión "resina de afinidad" o "resina de cromatografía de afinidad", como se usa en este documento, se refiere a un soporte cromatográfico al que se une el ligando de cromatografía (por ejemplo, PrA o PrG o PrL). El ligando es capaz de unirse a una molécula de interés (por ejemplo, una inmunoglobulina) que tiene que purificarse o retirarse de una mezcla. Resinas de cromatografía de afinidad basada en proteína A ejemplares para su uso en cromatografía de afinidad basada en proteína A incluyen proteína A inmovilizada en un esqueleto de vidrio de poro controlado, por ejemplo, las resinas PROSEP A™ y PROSEP vA™, High Capacity, Ultra y PROSEP Ultra Plus (Millipore Inc.); proteína A inmovilizada en una fase sólida de poliestireno, por ejemplo, la resina POROS 50A™ y POROS MabCapture A™ (Applied BioSystems Inc.); o proteína A inmovilizada en una fase sólida de agarosa, por ejemplo, la resina rPROTEIN A SEPHAROSE FAST FLOW™ o MABSELECT™ (GE Healthcare).

- 30 La Ig eluida (por ejemplo, IgG) puede someterse a etapas de purificación adicionales antes o después de la etapa de cromatografía de afinidad de proteína A. Las etapas de purificación adicionales ejemplares incluyen, aunque sin limitación, filtración, cromatografía con hidroxipatita, cromatografía de interacción hidrófoba (CIH), precipitación en sulfato amónico, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía de reparto débil, cromatografía de reparto fuerte, filtración en gel, etc.

- 35 En algunas realizaciones, la Ig eluida (por ejemplo, IgG) puede formularse en un vehículo farmacéuticamente aceptable y usarse para diversos usos de diagnóstico, terapéuticos u otros, conocidos para dichas moléculas.

- 40 Como se usa en este documento, las expresiones "lixiviación de proteína", "filtración de proteína", "proteína lixiviada", "lixiviación de Pr", "filtración de Pr" y "Pr lixiviada", se refieren al desprendimiento o lavado de proteína (Pr) (incluyendo intacta y/o fragmentos de la misma) de una fase sólida a la que está unida. En algunas realizaciones, la filtración de PrA, PrG o PrL se cuantifica a partir de resinas de cromatografía de afinidad basada en PrA, PrG o PrL usando los procedimientos de la invención. La filtración de proteína puede resultar debido a muchas razones diferentes. Por ejemplo, la filtración de PrA o lixiviación de PrA puede resultar debido a razones tales como cizalla mecánica, exposición a bajo/alto pH, contacto con inmunoglobulina, actividad proteolítica, etc. La lixiviación de proteína A puede medirse cualitativamente usando diversas técnicas que son bien conocidas en la técnica, incluyendo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), SDS PAGE, transferencia de Western, cromatografía líquida a alta presión (HPLC), espectrometría de masas, etc. La cantidad de PrA lixiviada generalmente se representa como ng de PrA/ml de matriz de afinidad, o puede representarse como ng de proteína A/mg de anticuerpo.

- 50 Como se usa en este documento, el término "inmunoglobulina", "Ig" o "anticuerpo" (usado de forma intercambiable en este documento) se refiere a una proteína que tiene una estructura de cadena de cuatro polipéptidos básica que consta de dos cadenas pesadas y dos ligeras, estando dichas cadenas estabilizadas, por ejemplo, por enlaces disulfuro entre cadenas, que tiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno. La expresión "inmunoglobulina de cadena sencilla" o "anticuerpo de cadena sencilla" (usadas de forma intercambiable en este documento) se refiere a una proteína que tiene una estructura de cadena de dos polipéptidos que consta de una cadena pesada y una ligera, estando estabilizadas dichas cadenas por ejemplo, por enlazadores peptídicos entre cadenas, que tiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno. El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena pesada o ligera que comprende bucles peptídicos (por ejemplo, que comprende 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, por lámina-β plegada y/o enlace disulfuro entre cadenas. Los dominios se mencionan adicionalmente en este documento como "constantes" o "variables", en base a la ausencia relativa de variación de secuencia dentro de los dominios de diversos miembros de la clase en el caso de un dominio "constante", o la variación significativa dentro de los dominios de diversos miembros de la clase en el

caso de un dominio "variable". "Dominios" de anticuerpo o polipéptido a menudo se mencionan de forma intercambiable en la técnica como "regiones" de anticuerpo o polipéptido. Los dominios "constantes" de cadenas ligeras de anticuerpo se mencionan de forma intercambiable como "regiones constantes de cadena ligera", "dominios constantes de cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" de cadenas pesadas de anticuerpo se mencionan de forma intercambiable como "regiones constantes de cadena pesada", "dominios constantes de cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH". Los dominios "variables" de cadenas ligeras de anticuerpo se mencionan de forma intercambiable como "regiones variables de cadena ligera", "dominios variables de cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL". Los dominios "variables" de cadenas pesadas de anticuerpo se mencionan de forma intercambiable como "regiones variables de cadena pesada", "dominios variables de cadena pesada", regiones "VH" o dominios "VH".

En algunas realizaciones, una inmunoglobulina es un anticuerpo IgG. Las inmunoglobulinas o anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden existir en forma monomérica o polimérica, por ejemplo, anticuerpos IgM que existen en forma pentamérica y/o anticuerpos IgA que existen en forma monomérica, dimérica o multimérica. El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos restos aminoacídicos que un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacta o completa. Los fragmentos pueden obtenerse por tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacta o completa. Los fragmentos también pueden obtenerse por medios recombinantes. Fragmentos ejemplares incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂, Fc y/o Fv.

La expresión "fragmento de unión a antígeno" se refiere a una parte polipeptídica de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une a un antígeno y compite con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que se obtuvo) por la unión al antígeno (es decir, unión específica). Los fragmentos de unión pueden producirse por técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab)₂, Fv, cadenas sencillas, y anticuerpos de cadena sencilla.

II. Estructura de wtPrA y sitios de unión a inmunoglobulina

La PrA es una proteína de aproximadamente 42 kDa obtenida de la bacteria *Staphylococcus aureus* y contiene cinco dominios de unión a inmunoglobulina (Ig) extracelulares altamente homólogos en tándem en el extremo N-terminal, denominados E, D, A, B y C. Cada dominio extracelular de PrA tiene distintos sitios de unión a Ig. Un sitio es para Fc γ (la región constante de la clase IgG de Ig) y el otro es para la porción Fab de ciertas moléculas Ig (la porción de la Ig que es responsable del reconocimiento de antígeno). Se ha informado de que cada uno de los dominios contiene un sitio de unión a Fab. La parte no de unión a Ig de SpA está localizada en el extremo C-terminal y se denomina la región X o dominio X.

La clonación del gen que codifica wtPrA se describe en la patente de los Estados Unidos Nº 5.151.350.

III. Medio de cromatografía de afinidad basada en Pr ejemplar

Los procedimientos de la invención pueden usarse para cuantificar la filtración de una proteína desde un medio o resina de cromatografía de afinidad de proteínas, donde dicha resina de cromatografía de afinidad basada en proteína se usa para aislar o purificar una molécula que se une a la proteína. En realizaciones ejemplares, los procedimientos de la invención se usan para cuantificar la filtración de una proteína desde un medio o resina de cromatografía de afinidad, donde dicho medio o resina se usa para aislar o retirar una inmunoglobulina de una mezcla, incluyendo aunque sin limitación, PrA, PrG y PrL y derivados, variantes y fragmentos de las mismas.

Las resinas basadas en proteína A ejemplares que pueden usarse en los procedimientos de la invención incluyen, aunque sin limitación, PROSEP vA High Capacity, PROSEP A Ultra, PROSEP Ultra Plus (Millipore), Protein A Sepharose FastFlow, rmp Protein A Sepharose FastFlow, MabSelect, MabSelect Xtra, MabSelect SuRe (GE Healthcare), POROS A, POROS MabCapture A (Applied Biosystems), y Sartobind Protein A (Sartorius). Resinas basadas en proteína G ejemplares incluyen, aunque sin limitación, PROSEP-G (Millipore), Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare), POROS G (Applied Biosystems).

IV. Marcas fluorescentes ejemplares y medición de fluorescencia

Puede usarse cualquier marca o colorante fluorescente adecuado que sea capaz de marcar una proteína en los procedimientos de la invención. En general, es deseable usar una marca o colorante fluorescente que tenga un coeficiente de extinción $\epsilon_{\text{máx}}$ no menor de $70.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ con un rendimiento cuántico de $>$ del 80% y que muestre una fotolixivación o inactivación mínima. El colorante usado debe ser estable en las condiciones del experimento, por ejemplo, un intervalo de pH de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10,0. Para medios de cromatografía de afinidad basados en proteína es deseable usar colorantes reactivos amina, tiol y carboxi. Los colorantes fluorescentes reactivos amina ejemplares incluyen, aunque sin limitación, ésteres de succinimidilo incluyendo ésteres de sulfosuccinimidilo, isotiocianatos, cloruros de sulfonilo, y ésteres de tetrafluorofenilo. Colorantes reactivos tiol ejemplares incluyen, aunque sin limitación, maleimidias, fenilmercurio, yodoacetamida, tiosulfatos, derivado de rodamina, y derivados de benzoxadiazol. En realizaciones ejemplares, los colorantes que pueden usarse para marcar un medio de cromatografía de afinidad basado en proteína incluyen AlexaFluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA), Dylight 488 (ThermoFisher, Waltham, MA), HiLyte Fluor™ 488, y 5-FAM, SE y 6-FAM, SE (Anaspec, San Jose,

CA).

Los procedimientos de la presente invención generalmente se basan en la medición de fluorescencia. En general, la fluorescencia es un tipo de espectroscopia óptica en la que se promueve una molécula a un estado electrónicamente excitado por absorción de radiación ultravioleta, visible, o cerca del infrarrojo. La molécula excitada después vuelve a caer al estado basal o a un estado electrónicamente excitado inferior por emisión de luz, que se detecta usando un instrumento tal como un fluorómetro. En el caso de los procedimientos de la presente invención, el colorante fluorescente es un colorante reactivo que se une a una proteína, por ejemplo, PrA. Es deseable que dicho colorante mantenga la intensidad fluorescente dentro de aproximadamente el 20% de la intensidad máxima en las condiciones experimentales usadas en los procedimientos de la invención, por ejemplo, uso de un pH en el intervalo de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10,0 durante al menos media hora.

V. Procedimientos para liberar la proteína marcada de la resina de cromatografía de afinidad basada en proteína

Después del marcaje de una proteína en un medio o resina de cromatografía basada en proteína, la proteína unida covalentemente se libera del medio o resina de afinidad. Los procedimientos para liberar una proteína marcada unida covalentemente del medio de afinidad incluyen, aunque sin limitación, procedimientos químicos y enzimáticos. En procedimientos de tratamiento químico ejemplares, puede usarse hidrólisis catalizada con ácido o base que no interfiere con la absorción UV significativamente. Ácidos ejemplares que pueden usarse en los procedimientos de la invención incluyen, aunque sin limitación, ácidos monovalentes tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácidos divalentes, tales como, ácido sulfúrico, y ácidos trivalentes, tales como ácido fosfórico. Bases ejemplares que pueden usarse en los procedimientos de la invención incluyen, aunque sin limitación, hidróxido sódico, hidróxido potásico, e hidróxido de cesio. Adicionalmente, pueden usarse agentes químicos tales como CNBr que puede romper ciertos enlaces peptídicos, liberando de este modo la proteína marcada del soporte sólido al que está unida. Véase, por ejemplo, Uhlen y Nilsson, en Proc. Biotech 85 (Europa), pág. 173 (1985).

Procedimientos de tratamiento enzimático ejemplares incluyen, aunque sin limitación, el uso de una enzima capaz de digerir una proteína. Enzimas ejemplares incluyen, aunque sin limitación, por ejemplo, tripsina, pepsina, quimotripsina, termolisina y subtilisina.

VI. Medición de la fluorescencia y concentración de proteína a partir de una resina tratada química o enzimáticamente

La resina tratada química o enzimáticamente posteriormente se filtra para obtener el sobrenadante libre de particulados. El sobrenadante contiene la proteína marcada digerida (por ejemplo, PrA), cuya fluorescencia puede medirse, por ejemplo, usando un espectrofotómetro UV/Vis a 275 nm. Esta lectura incluye la adsorción UV a la que ha contribuido la proteína digerida (por ejemplo, proteína A y fragmentos de proteína A digeridos de la resina). Para obtener específicamente la concentración de la proteína (por ejemplo, concentración de PrA o [PrA]), tiene que restarse la contribución del agente químico o enzima y el colorante fluorescente en la lectura de fluorescencia. La contribución del agente químico o enzima, $UV_{enz/quim}$, usados para liberar la proteína (por ejemplo, PrA) puede detectarse midiendo la concentración inicial del agente químico o enzima determinante en el factor de dilución. Además, la contribución de la marca o colorante fluorescente puede calcularse obteniendo la absorción UV en el máximo de la marca o colorante fluorescente, que es habitualmente UV a una longitud de onda de excitación, $UV_{máx}$. La proporción $UV_{275}/UV_{máx}$ (f) para cada colorante puede obtenerse típicamente del proveedor. Como ejemplo, suponiendo que el coeficiente de extinción para proteína A sea 0,149, la concentración de proteína A puede obtenerse usando la fórmula: $[UV_{275} - UV_{enz/quim} - UV_{máx} \times f] / 0,149$.

Se genera fluorescencia por excitación de una molécula a una cierta longitud de onda y detección a una longitud de onda mayor para recibir los espectros de emisión. En general, pueden usarse las longitudes de onda de excitación y emisión óptimas recomendadas por el proveedor del colorante fluorescente. Por ejemplo, para el colorante Alexa Fluor 488 de Invitrogen, la longitud de onda de excitación es 495 nm y la longitud de onda de emisión es 519 nm. Además, la lectura de fluorescencia puede obtenerse del sobrenadante con dilución en serie si fuera necesario. La fluorescencia típicamente se lee en un fluorómetro de cubeta o en formato de placa de pocillos a una temperatura establecida, tal como 25°C.

VII. Medición de la concentración del eluato

En los diversos procedimientos de acuerdo con la invención reivindicada, la concentración de la molécula o analito de interés eluido (por ejemplo, inmunoglobulina o Ig) se necesita para el cálculo de la proteína lixiviada, que se mide como ng de proteína lixiviada por mg de molécula eluida. En procedimientos ejemplares de acuerdo con la invención, la molécula eluida es una inmunoglobulina, que se aísla usando un medio de cromatografía de afinidad basada en PrA, PrG o PrL. En algunas realizaciones, la molécula eluida, por ejemplo, una inmunoglobulina, se libera del medio de cromatografía de afinidad usando cambios en el pH, fuerza iónica/concentración salina, y/o temperatura mediante cambios de gradiente o en etapas. Por ejemplo, en el caso de IgG, la elución de un medio de cromatografía basada en PrA se consigue típicamente bajando el pH de elución a menos de 5, pero no menos de pH 2, y más deseablemente entre pH 2 y 4. Tampones de elución ejemplares incluyen ácido acético, glicina, y ácido

cítrico. En algunas realizaciones, la elución de IgG se consigue mediante el flujo del tampón de elución a una velocidad de 2000 cm/h o menos, 1000 cm/h o menos, 800 cm/h o menos, 600 cm/h o menos, 200 cm/h o menos, 100 cm/h o menos o 50 cm/h o menos. En general, cuanto más lento es el caudal, más IgG se une al medio y típicamente mayor es la concentración de elución de IgG. Cuando el caudal de elución es < 5 cm/h, el medio se une casi a la cantidad máxima de IgG que puede unirse, y por tanto alcanza la capacidad de unión estática. Se usa una cantidad en exceso de IgG para ensayar la capacidad de unión estática, habitualmente > 3-5 veces la capacidad de unión máxima del medio. Por consiguiente, la cantidad de proteína A lixiviada habitualmente se define como ng de proteína A por mg de IgG en solución.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben entenderse como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Marcaje de resinas de cromatografía de afinidad basada en PrA con una marca fluorescente

Se marcaron resinas de cromatografía de afinidad de proteína A basadas en vidrio de poro controlado (por ejemplo, ProSep®-vA High Capacity y ProSep® Ultra PrA (Millipore)) con el colorante Alexa Fluor 488. En resumen, se disolvió 1 mg del colorante Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) en aproximadamente 1 ml de DMSO. Se trataron aproximadamente 3 ml de cada una de las resinas PrA con NaHCO₃ (0,1 M pH 8,4), se secaron al vacío y se compactaron en columnas Evergreen de 15 ml (Evergreen Scientific, Los Angeles, CA). Se añadieron aproximadamente 3 ml de NaHCO₃ a cada columna y las columnas se taparon y envolvieron en lámina de aluminio. Se añadieron aproximadamente 100 µl del colorante a cada columna y se pusieron en un agitador durante aproximadamente 0,5 horas. Se añadieron otros 100 µl de solución colorante a la columna y se agitaron durante otra hora. La columna se suspendió posteriormente y se lavó tres veces con aproximadamente 2 volúmenes de columna de NaHCO₃ cada vez, tres veces con aproximadamente 2 volúmenes de columna de etanol al 20% cada vez y dos veces con aproximadamente 2 volúmenes de columna de NaHCO₃ cada vez.

Las resinas marcadas se dividieron posteriormente en partes de 1 ml y se transfirieron a viales.

Ejemplo 2: Tratamiento enzimático de las resinas PrA marcadas con marca fluorescente

Una fracción de las resinas PrA marcadas de forma fluorescente se digirió posteriormente de forma enzimática. La resina PrA sin marcador fluorescente se usó como control. En resumen, se trató 1 ml de cada resina PrA con NH₄HCO₃ 0,1 M y se secó al vacío. Se disolvió tripsina en NH₄HCO₃ 0,1 M y la medición UV a 275 nm se tomó de tal modo que estuviera entre 0,7 y 1. Posteriormente se añadieron aproximadamente 3 ml de solución de tripsina a cada una de las resinas y se incubaron a 37°C durante aproximadamente 2 horas. La suspensión de medio incubado se filtró a través de una columna de goteo Evergreen de 7 ml para retirar el sobrenadante del medio. La medición del filtrado se tomó a UV_{275nmD} y la UV_{275nmT} de la tripsina se restó de este valor. Además, se tomó una medición UV_{495nmF} del filtrado. Se usó un coeficiente de extinción de 0,149 para obtener la concentración de Proteína A usando la fórmula (UV_{275nmD} X factor de dilución - UV_{275nmT} - f X UV_{495nmF} X factor de dilución)/0,149, que dio la concentración de Proteína A digerida, [PA]. El valor de *f* es la proporción del coeficiente de extinción UV del colorante a UV_{275nm}/UV_{495nm} y lo proporciona el proveedor del colorante fluorescente.

La fluorescencia del filtrado anterior se midió a una dilución ~2000 X (con glicina 0,1 M), que dio el valor [FL_{digest}].

Ejemplo 3: Medición de la concentración de eluato de IgG/capacidades estáticas de las resinas marcada y no marcada

La concentración de eluato de IgG/capacidades estáticas de resinas de cromatografía de afinidad basada en proteína A marcadas y no marcadas se determinaron del siguiente modo. La medición de la capacidad estática también es una indicación de si el marcaje de una resina PrA con una marca fluorescente altera o no la interacción de la resina PrA con IgG, por ejemplo.

Se midieron resinas PrA marcadas y no marcadas cada una en volúmenes de 1 ml (Evergreen Scientific, Los Angeles, CA) con golpeteo. Cada muestra se suspendió de nuevo y se equilibró con 10 ml de tampón salino fosfato 10 mM (PBS). Se descartó la elución por gravedad de PBS, seguido de la adición de 5 ml de glicina 0,1 M pH 2. Se descartó la elución. Se añadieron otros 5 ml de glicina 0,1 M pH 2 y se recogió la elución como FR_{fondo}. Se añadieron dos porciones de 5 ml de PBS para equilibrar el medio antes de la adición de 5 ml de hIgG policlonal ~50 mg/ml (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI). Esto estuvo seguido de otras dos porciones de 5 ml de PBS. Todas las eluciones por gravedad de PBS e IgG se descartaron. Se añadió glicina (5 ml, 0,1 M, pH 2) y se recogió el eluato, marcado como FR₁. Se añadieron otros 5 ml de solución de glicina y se recogió el eluato, marcado como FR₂. Se tomó una medición de UV a 280 nm para obtener la concentración de IgG de elución [IgG]. Los resultados de uno de dichos experimentos para medir las capacidades estáticas de las resinas PrA se representa en la Figura 2. Como se demuestra por la Figura 2, la interacción de cada una de las resinas PrA con IgG no se alteró por la adición del colorante fluorescente a la resina. Además, las mediciones de las capacidades estáticas se representan en la Tabla de la Figura 2. La concentración del eluato [IgG] se mide a A_{280nm} usando FR₁ X factor de dilución + A_{280nm} de FR₂ X factor de dilución/coeficiente de extinción de IgG. La fluorescencia se mide posteriormente a 519 nm con excitación

ES 2 391 931 T3

a 495 nm usando un fluorómetro Jasco FP-6500 (Great Dunmow, RU). El valor de fluorescencia de FR₁ y FR₂ del medio no marcado se resta del de medio marcado correspondiente. La suma de la señal de fluorescencia de la fracción 1 y la fracción 2 de lo anterior se resta adicionalmente por Fr_{fondo} para obtener [F_{L-IgG}]. La Proteína A lixiviada de la resina se calcula usando la siguiente fórmula: $\{(F_{L-IgG})/((F_{L-digest})/[PrA])\}/[IgG]$.

5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para cuantificar la filtración de proteína desde una resina de cromatografía de afinidad basada en proteína, seleccionándose dicha proteína entre Proteína A (PrA), Proteína G (PrG) y Proteína L (PrL), comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - 5 (a) marcar la resina de cromatografía basada en proteína con una o más marcas fluorescentes;
 - (b) dividir la resina marcada en una primera y segunda partes iguales;
 - (c) tratar la primera parte con un medio adecuado para liberar la proteína marcada de la resina y añadir una cantidad en exceso de inmunoglobulina (Ig) a la segunda parte;
 - 10 (d) medir la fluorescencia (FL_{digest}) y la concentración de proteína ([proteína]) de la resina tratada en la primera parte de la etapa (c); y
 - (e) medir la concentración de eluato de Ig de la resina ([Ig]) y la señal de fluorescencia en un eluato de Ig (FL_{Ig}) de la segunda parte de la etapa (c),
en el que la filtración de proteína se cuantifica calculando $\{(FL_{Ig})/((FL_{digest})/[proteína])\}/[Ig]$.
- 15 2. Un procedimiento para cuantificar la filtración de proteína desde una resina de cromatografía de afinidad basada en proteína, seleccionándose dicha proteína entre Proteína A (PrA), Proteína G (PrG) y Proteína L (PrL), comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - (a) marcar la resina de cromatografía basada en proteína con una o más marcas fluorescentes;
 - (b) añadir una cantidad en exceso de inmunoglobulina (Ig) a la resina marcada y medir la concentración de eluato de Ig de la resina ([Ig]) y la señal de fluorescencia en un eluato de Ig (FL_{Ig}) de la resina;
 - 20 (c) retirar la Ig residual de la resina seguido de tratamiento de la resina con un medio adecuado para liberar la proteína marcada de la resina; y
 - (d) medir la fluorescencia (FL_{digest}) y la concentración de proteína ([proteína]) de la resina tratada;
en el que la filtración de proteína se cuantifica calculando $\{(FL_{Ig})/((FL_{digest})/[proteína])\}/[Ig]$.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la inmunoglobulina es una IgG.
- 25 4. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, que comprende adicionalmente la etapa de retirar la proteína lixiviada usando una o más de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio hidrófobo, cromatografía de reparto débil, cromatografía con hidroxiapatita, o cualquier combinación de las mismas.
- 30 5. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la marca fluorescente se selecciona entre el grupo compuesto por Alexa Fluor 488, Dylight 488, HiLyte Fluor 488, 5-FAM, SE y 6-FAM, SE.
6. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que el medio adecuado comprende tratamiento químico.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el tratamiento químico comprende el uso de un ácido o base.
8. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que el medio adecuado comprende tratamiento enzimático.
- 35 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el tratamiento enzimático comprende el uso de tripsina, pepsina, quimotripsina, termolisina y subtilisina.
10. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la resina de cromatografía basada en proteína se selecciona entre el grupo compuesto por ProSep A high capacity, ProSep A Ultra, ProSep Ultra Plus, Mabselect, Mabselect Xtra, Mabselect Sure, Sepharose Protein A, Sartobind Protein A y Protein Sepharose Fast Flow.
11. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la fluorescencia se mide usando un fluorómetro.
- 40 12. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la Ig se eluye usando un pH adecuado.
13. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la Ig es monoclonal.
14. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la Ig es policlonal.

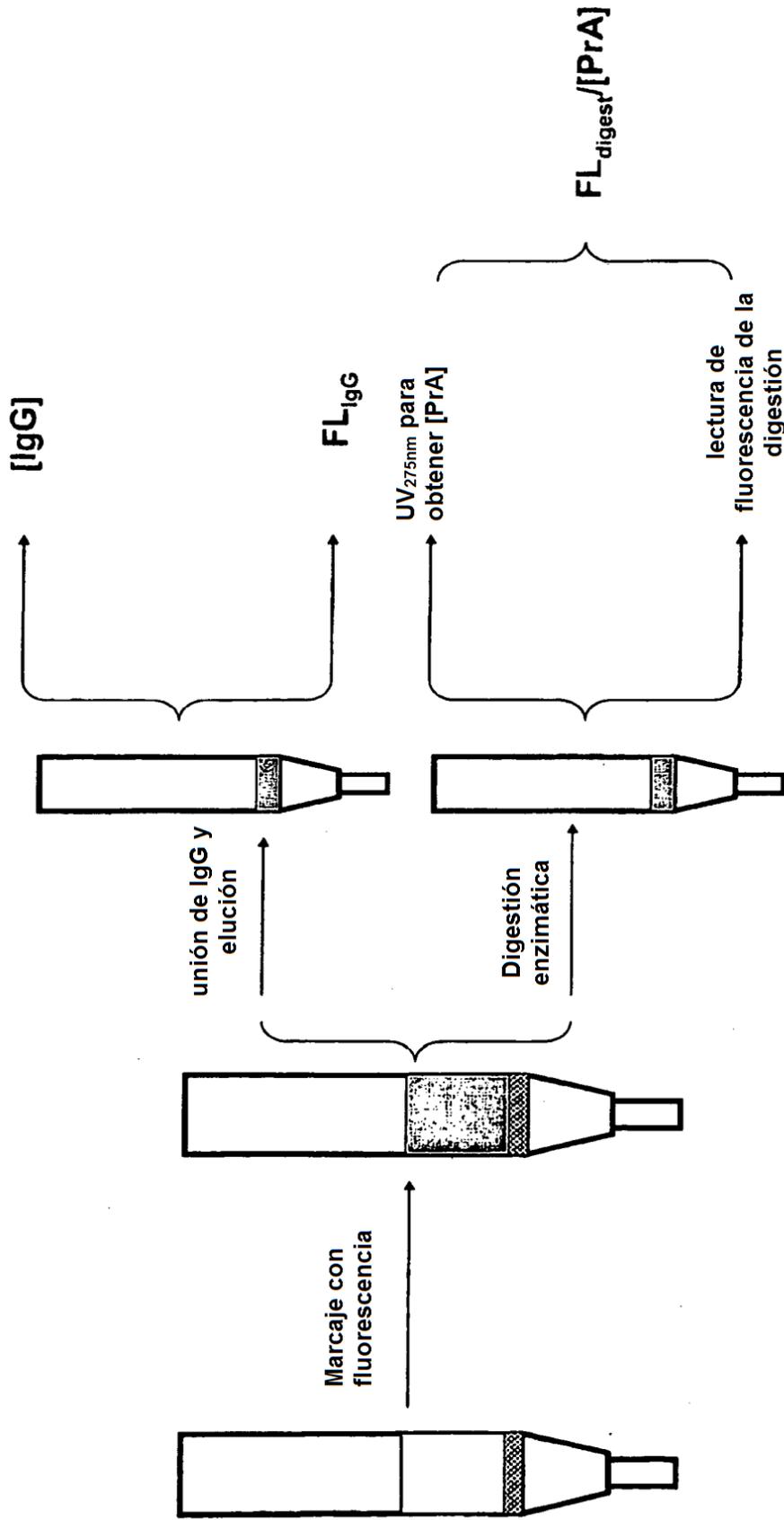
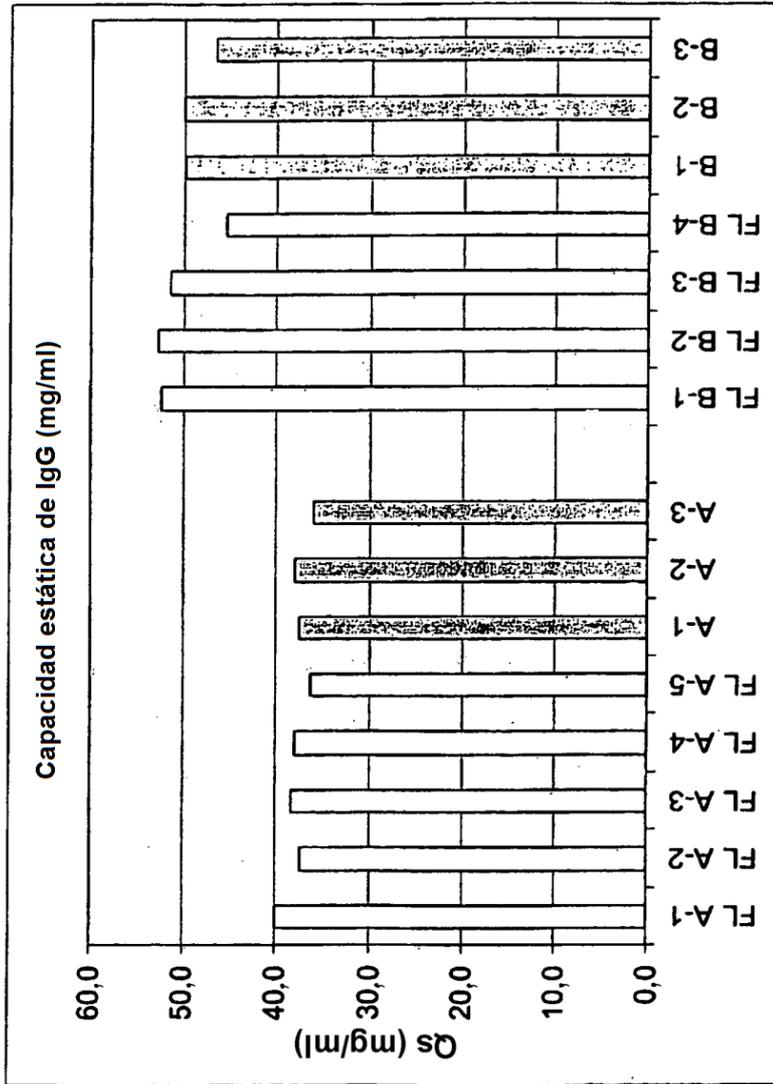


FIG. 1



	Medio A	Medio B
Qs	38	49,8
STD	1,4	2,8
CV	4%	6%

FIG. 2

Medio B	serie 1	serie 2	prom.	dt	CV
Lote 1	59,9	57,5	58,7	1,7	2,9%
Lote 2	51,9	46,1	49,0	4,1	8,4%
Lote 3	68,7	69,2	69,0	0,3	0,5%
Lote 4	80,1	80,1	80,1	0,0	0,0%
Lote 5	71,4	70,9	71,2	0,4	0,6%

FIG. 3