

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 556**

51 Int. Cl.:

C07D 251/48 (2006.01)

B01J 20/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2007 E 07712978 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 1989189**

54 Título: **Adsorbentes para la purificación de proteínas**

30 Prioridad:

02.03.2006 GB 0604236

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

21.11.2013

73 Titular/es:

**PROMETIC BIOSCIENCES LTD (100.0%)
FREEPORT, BALLASALLA
BRITISH ISLES IM9 2AP, GB**

72 Inventor/es:

**BETLEY, JASON RICHARD;
TATTON, HELEN;
LE RICHE, KELLY y
WEBB, MATTHEW**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 430 556 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

Adsorbentes para la purificación de proteínas

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a compuestos y a sus usos como ligandos de afinidad para la purificación de proteínas.

10 **Antecedentes de la invención**

10 Los anticuerpos son glicoproteínas de inmunoglobulina que tienen una unidad básica de una estructura monomérica. El monómero es una proteína en forma de Y que consiste en cuatro cadenas polipeptídicas, dos de las cuales son cadenas pesadas idénticas y dos son cadenas ligeras idénticas conectadas mediante puentes disulfuro. Hay cinco tipos diferentes de cadena pesada γ , μ , α , ϵ y δ) que distinguen las clases de inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, IgD y IgE, respectivamente). También hay dos tipos diferentes de cadena ligera (λ y κ) que resultan de diferentes productos génicos.

15 La IgG (una inmunoglobulina monomérica de aproximadamente 150 kD de tamaño) proporciona inmunidad basada en anticuerpos frente a patógenos invasores y, debido a la alta especificidad que tiene la IgG hacia antígenos específicos dentro del cuerpo, es el reactivo más comúnmente usado en investigación inmunológica y diagnósticos clínicos.

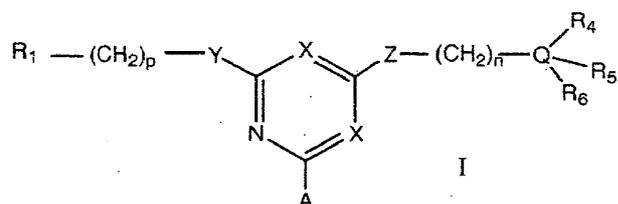
20 Anticuerpos monoclonales (en el presente documento denominados AcM) son anticuerpos que tienen especificidad idéntica hacia un único antígeno y se generan a partir de una línea celular que se ha producido a partir de una única célula clonada. Los AcM constituyen el sector de más rápido crecimiento en la industria biofarmacéutica en la que se estima que las ventas alcanzarán los 30 mil millones de \$ (EE.UU.) en el 2010. Los títulos de anticuerpos de cultivos celulares de mamíferos han continuado mejorando a lo largo de los últimos 20 años y se requieren adsorbentes de cromatografía y procedimientos posteriores alternativos para solucionar el atolladero del procedimiento en el procesamiento de los AcM.

25 Los fragmentos de anticuerpos (partes de moléculas de anticuerpos completos) ofrecen varias ventajas con respecto a anticuerpos completos. Son más fáciles y más rentables de fabricar, tienen menos efectos secundarios en pacientes, reduciendo el riesgo de liberación de citocinas y su toxicidad asociada, debido a la ausencia de la región Fc (cadena pesada), y pueden modificarse para incluir cargas terapéuticas. Hay varios tipos de fragmentos de anticuerpos que son dominios de IgG' o bien preparados mediante digestión con enzima endopeptidasa específica o bien que se han diseñado por ingeniería genética en líneas celulares. Éstos incluyen fragmentos monovalentes tales como Fab', Fab y scFv; fragmentos bivalentes tales como minicuerpos y diacuerpos F(ab')₂; y fragmentos multivalentes tales como triacuerpos y tetracuerpos.

30 Muchos productos de fragmentos de anticuerpos están en desarrollo para su uso como agentes terapéuticos o en diagnóstico. Se espera que fragmentos de anticuerpos recombinantes tengan una cuota significativa en el mercado de diagnóstico de unos 6 mil millones de \$ (EE.UU.) al año, desde inmunoensayos *in vitro* hasta aplicaciones de obtención de imágenes de tumores o coágulos *in vivo* (Holliger, P., y Hudson P.J., Nat. Biotech 23 (9; 2005) 1126-1136).

35 La mayoría de los productos de fragmentos de anticuerpos carecen de un sitio de unión a proteína A y por tanto, a diferencia de anticuerpos de cadena completa, no pueden purificarse mediante cromatografía de afinidad a proteína A. En la mayoría de los casos, se usan técnicas de cromatografía convencionales para purificar fragmentos de anticuerpo. La proteína L, una proteína con un peso molecular de 35000 Dalton derivada de una especie bacteriana de *Peptostreptococcus magnus*, se sabe que se une a cadenas ligeras de anticuerpos y se ha investigado para la purificación de algunos fragmentos de anticuerpos pero no se considera que sea rentable ni se encuentra disponible en cantidades comerciales.

40 El documento WO97/10887 da a conocer compuestos a base de triazina, útiles como adsorbentes de afinidad, de fórmula I



en la que:

R₁ es H, alquilo, hidroxialquilo, ciclohexilo, NH₂, fenilo, naftilo, 1-fenilpirazol, indazol, benzotiazol, benzoxazol o bencimidazol, cualquier grupo aromático de los cuales puede estar sustituido con uno o más de alquilo, alcoxilo, aciloxilo, acilamino, amino, NH₂, OH, CO₂H, sulfonilo, carbamoilo, sulfamoilo, alquilsulfonilo y halógeno;

5 un X es N y el otro es N, C-Cl o C-CN;

Y es O, S o NR₂;

10 Z es O, S o NR₃;

R₂ y R₃ son cada uno H, alquilo, hidroxialquilo, bencilo o β-feniletilo;

15 Q es benceno, naftaleno, benzotiazol, benzoxazol, 1-fenilpirazol, indazol o bencimidazol;

R₄, R₅ y R₆ son cada uno H, OH, alquilo, alcoxilo, amino, NH₂, aciloxilo, acilamino, CO₂H, ácido sulfónico, carbamoilo, sulfamoilo, alquilsulfonilo o halógeno;

20 n es de 0 a 6;

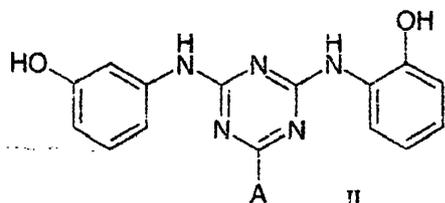
p es de 0 a 20; y

A es una matriz de soporte unida opcionalmente al anillo que contiene X mediante un espaciador.

25 Se da a conocer que compuestos de fórmula I tienen afinidad por proteínas tales como inmunoglobulinas, insulina, factor VII u hormona de crecimiento humana.

Se dan a conocer compuestos de estructura relacionada en los documentos WO 00/67900 y WO 03/097112. Tienen afinidad por endotoxinas.

30 Determinados compuestos a base de triazina dados a conocer en el documento WO 97/10887 tienen afinidad por inmunoglobulinas. Un ejemplo de un compuesto que muestra tal afinidad es un compuesto de estructura II



35 Compuestos tales como II pueden separar inmunoglobulinas específicamente de mezclas complejas o materias primas tales como plasma humano.

40 Otro tipo de materia prima comúnmente encontrada es un sobrenadante de cultivo celular producido industrialmente, en el que están presentes anticuerpos monoclonales en concentraciones de hasta 5 g/l de sobrenadante. Compuestos tales como II también pueden ser útiles para la eliminación específica de anticuerpo monoclonal de estas mezclas, aunque se sabe que su rendimiento se ve comprometido por la presencia de aditivos de cultivos celulares tales como Pluronic F-68.

45 Pluronic F-68 es un agente antiespumante comúnmente usado en cultivo de células de mamífero. Es un copolímero de bloque de polioxietileno y polioxipropileno, y tiene un peso molecular de aproximadamente 8000 Da. Se usa Pluronic F-68 para proteger las células del daño por cizallamiento y burbujas de aire, y se usa normalmente en una cantidad de 1 g/l en sobrenadantes de cultivo celular. Su presencia puede reducir o suprimir la capacidad de compuestos tales como II para separar inmunoglobulinas de tales materias primas, lo que representa un obstáculo considerable para el uso de tales ligandos para la captura directa de anticuerpos monoclonales a partir de medios de cultivo de células de mamífero.

Sumario de la invención

55 Sorprendentemente, se ha encontrado que determinados compuestos, muchos de los cuales son novedosos, son útiles para la purificación basada en afinidad de inmunoglobulinas, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos, incluso en presencia de compuestos tales como Pluronic F-68. Los compuestos para su uso en la invención se definen en la reivindicación 1.

Además, los compuestos de la invención incluyen los ligandos correspondientes, en los que A se reemplaza por un grupo funcional, unido directa o indirectamente al anillo de triazina, que puede inmovilizarse sobre una matriz de soporte. Los términos "ligando" y "adsorbente" pueden usarse de manera intercambiable, a continuación.

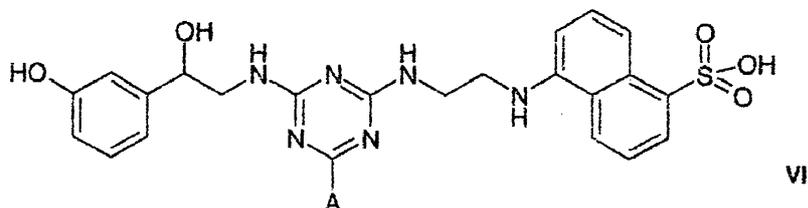
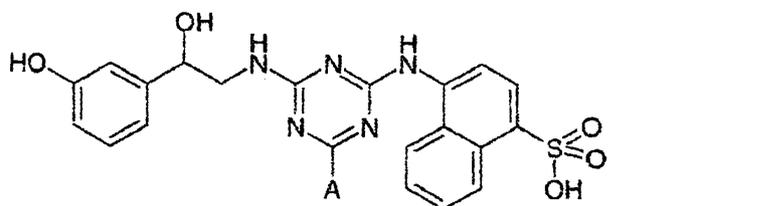
5 Descripción de la invención

Los documentos WO 97/10887, WO 00/67900 y WO 003/097112 dan a conocer cómo pueden construirse bibliotecas combinatorias de ligandos sobre un soporte sólido. Sus descripciones, incluyendo ejemplos de realizaciones y procedimientos comunes a la presente invención, se incorporan en el presente documento como referencia. Durante el examen de un conjunto de estas bibliotecas combinatorias con una materia prima que contiene albúmina, inmunoglobulinas y Pluronic F-68, se identificó que varios ligandos podían unirse selectivamente a y eluir inmunoglobulinas.

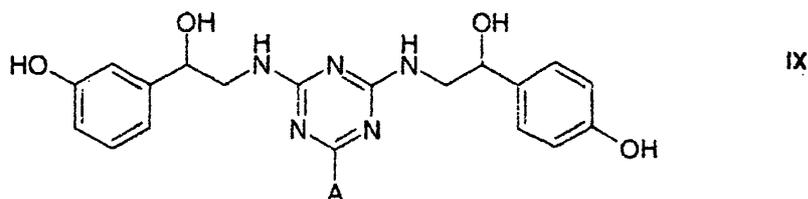
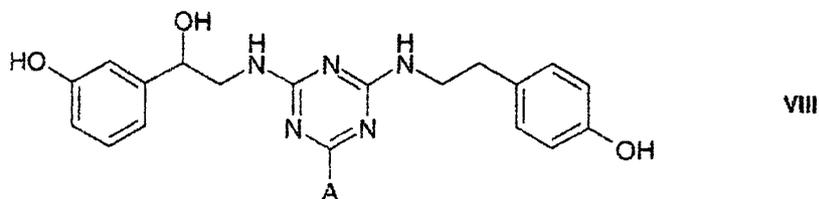
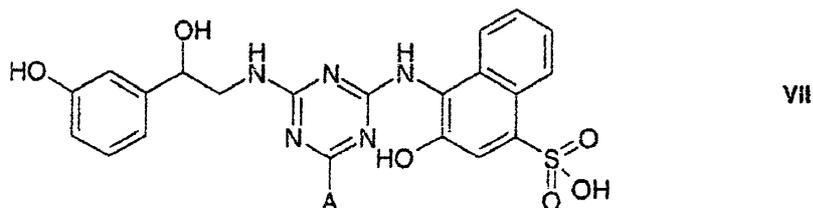
Los compuestos según la reivindicación 1 para su uso en la invención pueden prepararse mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Tales procedimientos se describen en las 3 publicaciones PCT identificadas anteriormente; pueden adaptarse fácilmente a la preparación de nuevos compuestos.

Tales compuestos sustituidos son novedosos.

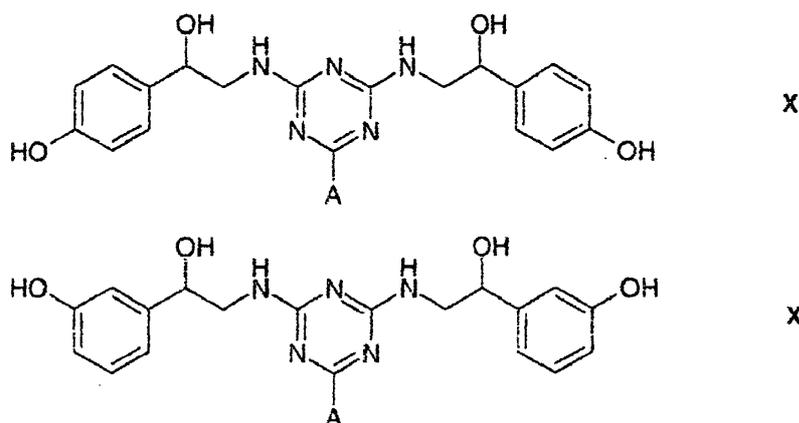
20 Adsorbentes o ligandos de unión a inmunoglobulinas de la invención son de las fórmulas



25



30



- 5 Los ligandos de unión a inmunoglobulinas descritos en el presente documento son útiles para la purificación de inmunoglobulinas a partir de mezclas complejas incluyendo, pero sin limitarse a, plasma humano y sobrenadantes de fermentación recombinantes. Esta utilidad se demuestra a continuación en el ejemplo 2, mediante experimentos de cromatografía usando varias materias primas.
- 10 El término "inmunoglobulina" se usa en el presente documento para describir a las propias inmunoglobulinas intactas, incluyendo IgG, IgA, IgM e IgE, y también análogos que tienen las características funcionales o estructurales de las inmunoglobulinas, por ejemplo en cuanto a afinidad por un compuesto dado descrito en el presente documento. Por tanto, el analito puede ser una proteína que es un fragmento funcional de una inmunoglobulina, o un análogo estructural que tiene uno, más o todos los mismos sitios de unión, o una proteína de fusión.
- 15

El ligador opcional puede comprender cualquier medio de unión de ligandos de la invención a matrices de soporte y que proporciona un medio de separación del ligando de la superficie de la matriz de soporte. La matriz de soporte puede comprender cualquier material, soluble o insoluble, particulado o no particulado, incluyendo fibras y membranas, poroso o no poroso. Proporciona un medio conveniente de separación de ligandos de la invención de solutos en una disolución en contacto. Los ejemplos de matriz de soporte y ligador opcional A incluyen matrices de hidratos de carbono tales como agarosa, celulosa, dextrano, almidón, alginato o carragenanos; matrices de polímeros sintéticos tales como poliestireno, copolímeros de estireno-divinilbenceno, polimetacrilatos, (por ejemplo poli(metacrilato de hidroxietilo), poli(alcohol vinílico), poliamidas o perfluorocarbonos; matrices inorgánicas tales como vidrio, sílice u óxidos de metal; y materiales compuestos.

20

25

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

30 Ejemplo 1 - Síntesis de adsorbentes

Se explica la síntesis de adsorbentes del tipo descrito en los documentos WO 97/10887, WO 00/67900 y WO 003/097112. Se describe la síntesis del adsorbente XI y es típica.

35 Se suspendió gel de agarosa PuraBead reticulado al 6% (650 g sedimentados en agua RO) con agua RO (650 ml), hidróxido de sodio 10 M (NaOH) (88 ml) y epiclorohidrina (124 ml). Se agitó la suspensión a lo largo de 19 horas. Entonces se añadieron hidróxido de sodio 10 M (NaOH) (22 ml) y epiclorohidrina (37 ml) adicionales y se agitó la suspensión a lo largo de 1,5 horas. Tras tomarse una muestra para análisis, se filtró la suspensión, luego se lavó con agua RO (12 x 1 l). El análisis de grupos epoxídicos mostró que se derivatizó el gel con 21,6 μmol de grupos epoxídicos por g de gel sedimentado.

40

Se drenó el gel antes de añadirse agua RO (780 ml) y disolución de amoníaco de peso específico 0,88 (200 ml). Se agitó la mezcla y se calentó hasta 40°C, luego se agitó a esta temperatura a lo largo de 16 horas. Tras tomarse una muestra para análisis, se filtró la suspensión y luego se lavó con 12 x 1 l de agua RO (12 x 1 l). El análisis de TNBS para grupos amina mostró que se derivatizó el gel con 20,8 μmol de grupos amina por g de gel sedimentado.

45

Se suspendió el gel aminado sedimentado (475 g) en fosfato de potasio 1 M (475 ml) y se dejó sedimentar. Entonces se añadió fosfato de potasio 1 M (140 ml), se agitó vigorosamente la mezcla y se añadió acetona (70 ml). Se enfrió la mezcla hasta 0°C en un baño de sal y hielo, antes de añadirse cloruro cianúrico (11,9 g) en acetona fría (120 ml) en una porción. Se agitó la suspensión a lo largo de 1 hora a 0-4°C, antes de drenarse, luego se lavó con acetona acuosa al 50% v/v (5 x 500 ml), agua RO (5 x 500 ml), con acetona acuosa al 50% v/v (5 x 500 ml) y agua RO (10 x 500 ml). El análisis reveló la unión de 25 μmol de grupos diclorotriazina por g de gel sedimentado.

50

Se suspendió la agarosa de diclorotriazinilo (50 g) en agua RO (55 ml). Se disolvió clorhidrato de norfenilefrina

(1,99 g) en agua RO (15 ml), se añadió NaOH 10 M (0,95 ml) y se enfrió la mezcla en hielo, antes de la adición a la agarosa de diclorotriazinilo. Se hizo reaccionar la mezcla a 60°C a lo largo de 19 horas. Se lavó el gel con DMF al 50% (5 x 100 ml), agua RO (5 x 100 ml), HCl 0,1 M (5 x 100 ml), IPA al 30%/NaOH 0,2 M (5 x 100 ml), agua RO (10 x 100 ml) y etanol acuoso al 20% (3 x 100 ml) antes del almacenamiento en la sala fría en etanol acuoso al 20%.

5

Ejemplo 2 - Cromatografía

Se realizaron experimentos de cromatografía con cada uno de los adsorbentes tabulados en la tabla 1. Para todos los experimentos, se usó una columna de 1 cm de diámetro con una altura de lecho de 5,5 cm y un volumen de columna (VC) de 4,3 ml con una velocidad de flujo lineal de 300 cm/h. Se equilibró inicialmente el adsorbente con 10 VC de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4, y luego se cargó con IgG pura, materia prima de IgG 1 (IgG 1 g/l, Pluronic F-68 1 g/l y otras proteínas para imitar el sobrenadante de cultivo celular) o 2 (IgG 1 g/l, Pluronic F-68 1 g/l con suero de ternero fetal al 5%), o materia prima de IgG₁ murina hasta una concentración de 30 g/l de adsorbente. Entonces se lavó el adsorbente con 10 VC de PBS, pH 7,4, antes de eluir la IgG con 5 VC de ácido cítrico 50 mM, pH 3,5. Se sometió entonces el adsorbente a una limpieza en su sitio (CIP) con 5 VC de hidróxido de sodio 0,5 M seguido por reequilibrado del adsorbente con 7 VC de PBS, pH 7,4.

10

15

20

Posteriormente al experimento de cromatografía, se evaluaron el contenido en IgG de la carga, el lavado tras la carga, la elución y las fracciones de CIP mediante nefelometría, A280, HPLC o GPC, para evaluar las capacidades de unión y elución y análisis por SDS PAGE para evaluar la pureza. Se resumen las capacidades de unión y elución en la tabla 1.

25

30

La alimentación de IgG pura contenía 1 g/l de IgG policlonal en PBS, pH 7,4 en presencia o ausencia de Pluronic F-68 1 g/l. La materia prima simulada 1 contenía IgG policlonal 1 g/l, mioglobina esquelética de caballo 1 g/l, albúmina sérica humana 5 g/l y Pluronic F-68 1 g/l en medio de cultivo de células CHO. La materia prima simulada 2 contenía IgG policlonal 1 g/l, suero bovino fetal al 5% y Pluronic F-68 1 g/l en medio de cultivo de células CHO.

Tabla1

Alimentación	Adsorbente	XI	VI	VII	IV	V	X	IX	VIII
IgG pura	Capacidad de unión	3,6					13,3	11,2	16,4
	Capacidad de elución								9,1
Materia prima de IgG 1	Capacidad de unión	4,3	2,9	3,2	1,5	1,1			3,75
	Capacidad de elución	2,3	0,78*	2,8	0,1	0,1			4,61
Materia prima de IgG 2	Capacidad de unión	5,7	3,9				3,3	7,51	
	Capacidad de elución	3,8	0,0				0,12	0,92	
IgG ₁ murina	Capacidad de unión	1,98	2,8						
	Capacidad de elución	1,1	0,0						

* Tampón de elución ácido cítrico 50 Mm, pH 3,5 con etilenglicol al 30% y NaCl 2 M

35

40

45

Se investigó adicionalmente el rendimiento cromatográfico del adsorbente XI, para evaluar la capacidad de purificación del material. Se completaron experimentos usando una columna de 1 cm de diámetro con una altura de lecho de 2,5 cm y un volumen de columna (VC) de 2,0 ml y una velocidad de flujo lineal de 50 cm/h (tiempo de residencia de 3 minutos). Se equilibró inicialmente el adsorbente con 10 VC de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4. Se cargaron en la columna 60 ml de IgG₁ en un sobrenadante de cultivo de células CHO (ovario de hámster chino) hasta una concentración de 54 g/l de adsorbente. Entonces se lavó el adsorbente con 10 VC de PBS, pH 7,4, antes de eluir la IgG con 5 VC de citrato de sodio 50 mM a pH 3,0. Se sometió entonces el adsorbente a una limpieza en su sitio (CIP) con 5 VC de hidróxido de sodio 0,5 M seguido por reequilibrado del adsorbente con 7 VC de PBS, pH 7,4. Se recogieron fracciones (2 ml) durante toda la cromatografía y se analizaron para determinar el contenido en IgG (HPLC de proteína A), contenido en ADN (análisis con Picogreen) y proteína total (ensayo de proteína total de Bradford). El perfil de ruptura de IgG₁ para el adsorbente XI muestra que la capacidad de unión es de 21,6 g/l y la capacidad de elución es de 20,9 g/l. Usando cromatografía de permeación en gel, se determinó que la pureza de la IgG eluida era del 92,8% y el adsorbente XI tiene un aclaramiento logarítmico de ADN de 2.

50

Se completaron experimentos de cromatografía con el adsorbente XI usando fragmentos de anticuerpos preparados mediante digestión enzimática (pepsina). La pepsina es una endopeptidasa no específica que sólo es activa a pH ácido y se desnaturaliza irreversiblemente a pH neutro o alcalino. La digestión con pepsina da como resultado la generación de un fragmento F(ab')₂ y varios péptidos pequeños del fragmento Fc. Se prepararon fragmentos de anticuerpos policlonales humanos, ovinos y bovinos (población mixta de anticuerpos) poniendo en contacto la IgG con pepsina durante 1 hora a 37°C a pH 4,0. Se detuvo la digestión ajustando el pH por encima de 7,0, y se

separaron los fragmentos $F(ab')_2$ mediante filtración en gel.

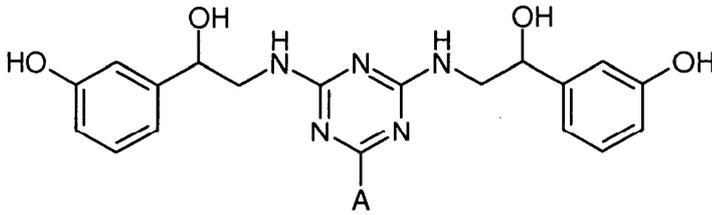
5 Se investigó el rendimiento cromatográfico del adsorbente XI para evaluar la capacidad de purificación del material para fragmentos de anticuerpo. Se completaron experimentos usando una columna de 1 cm de diámetro con una altura de lecho de 2,5 cm y un volumen de columna (VC) de 2,0 ml con una velocidad de flujo lineal de 50 cm/h (tiempo de residencia de 3 minutos). Se equilibró inicialmente el adsorbente con 10 VC de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4. Se cargaron aproximadamente 20 mg de fragmentos $F(ab')_2$ por ml de adsorbente. Entonces se lavó el adsorbente con 10 VC de PBS, pH 7,4, antes de eluir los fragmentos con 5 VC de citrato de sodio 50 mM a pH 3,0. Se sometió entonces el adsorbente a una limpieza en su sitio (CIP) con 5 VC de hidróxido de sodio 0,5 M seguido por reequilibrado del adsorbente con 7 VC de PBS, pH 7,4. El control para todos los experimentos fue adsorbente de proteína L (usando las mismas condiciones experimentales que para el adsorbente XI). Se recogió cada fracción de la columna de cromatografía y se analizó usando técnicas de inmunotransferencia de tipo Western. Esta técnica indicó que el adsorbente XI se unía tanto a cadena ligera kappa y lambda humana como a fragmentos $F(ab')_2$ ovinos y bovinos ; la proteína L se une sólo a cadena ligera kappa humana y no se une a fragmentos bovinos ni ovinos

10

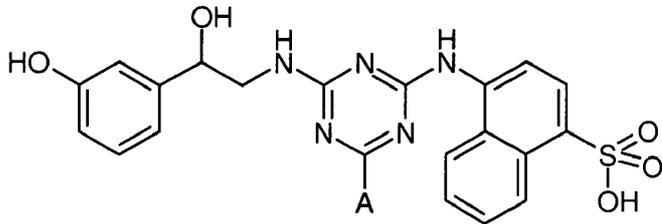
15

REIVINDICACIONES

1. Uso de un adsorbente de afinidad para la separación, la eliminación, el aislamiento, la purificación, la caracterización, la identificación o la cuantificación de un material proteínico, en el que el adsorbente de afinidad es un compuesto de fórmula XI, V, VI, VII, VIII, IX o X

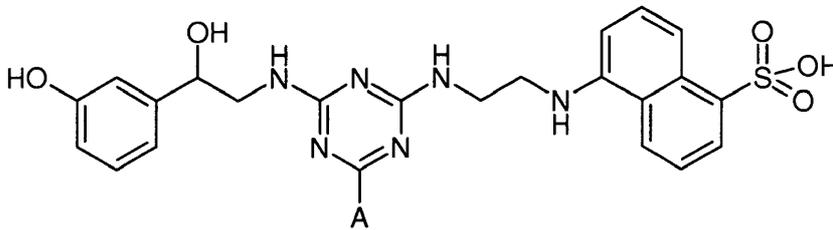


XI

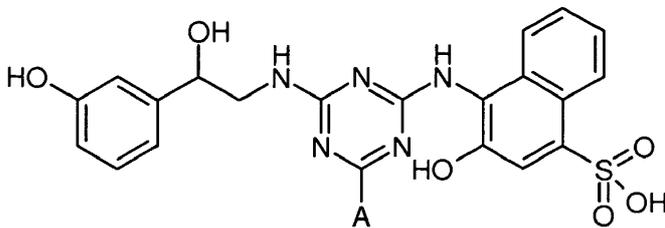


V

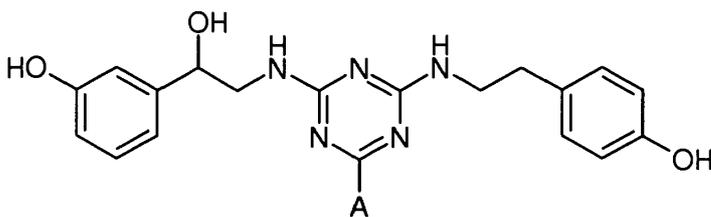
10



VI

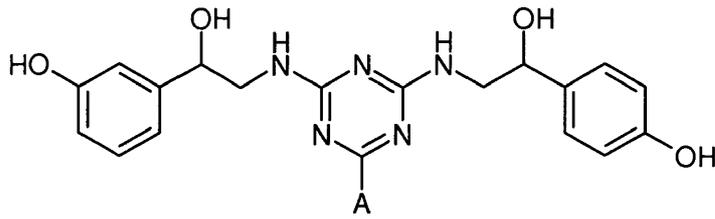


VII

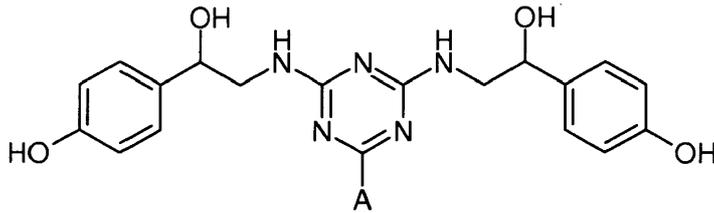


VIII

15



IX



X

- 5 en la que A es una matriz de soporte unida opcionalmente al anillo de triazina mediante un espaciador.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que el material proteínico es una inmunoglobulina, fragmento de inmunoglobulina o proteína.
- 10 3. Uso según la reivindicación 2, en el que el material es un anticuerpo monoclonal.
4. Uso según la reivindicación 2, en el que el material es un fragmento de inmunoglobulina seleccionado de fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, scFV, de diacuerpo, minicuerpo, tricuerpo y tetracuerpo.
- 15 5. Uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el material proteínico está en cultivo celular.
6. Uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el material proteínico está en combinación con un agente antiespumante.
- 20 7. Uso según la reivindicación 6, en el que el agente antiespumante es un copolímero de bloque de polioxietileno y polioxipropileno.
8. Compuesto según la reivindicación 1.