

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 462 392**

51 Int. Cl.:

G01N 30/28 (2006.01)

B01D 15/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2007** **E 07765375 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014** **EP 2032230**

54 Título: **Procedimiento para la optimización de procedimientos de cromatografía de purificación para biomoléculas**

30 Prioridad:

14.06.2006 DE 102006027496

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

22.05.2014

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA GMBH & CO.
KG (100.0%)
55216 Ingelheim am Rhein , DE**

72 Inventor/es:

**ECKERMANN, CHRISTIAN;
EBERT, SYBILLE;
RUBENWOLF, STEFANIE y
AMBROSIUS, DOROTHEE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 462 392 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

Procedimiento para la optimización de procedimientos de cromatografía de purificación para biomoléculas

- 5 La invención se refiere a un procedimiento que posibilita el desarrollo y la optimización de procedimientos de cromatografía de purificación para biomoléculas que se pueden llevar a cabo a gran escala.

Antecedentes de la invención

- 10 Las biomoléculas tales como proteínas, polinucleótidos, polisacáridos y similares están obteniendo cada vez más importancia comercial como medicamentos, como medios de diagnóstico, como aditivos en alimentos, detergentes y similares, como reactivos de investigación y para muchas otras aplicaciones. La necesidad de tales biomoléculas por norma general —por ejemplo, en el caso de proteínas— ya no se puede satisfacer mediante el aislamiento de las moléculas de fuentes naturales, sino que requiere el empleo de métodos de producción biotecnológica.

- 15 La producción biotecnológica de proteínas comienza típicamente con el aislamiento del ADN que codifica la proteína deseada y su clonación en un vector de expresión adecuado. Después de la introducción mediante transfección del vector de expresión en células de expresión procariontas o eucariotas adecuadas y posterior selección de las células transfectadas, las últimas se cultivan en fermentadores y se expresa la proteína deseada. A continuación se produce la recuperación de las células o del sobrenadante del cultivo y el tratamiento y la purificación de la proteína allí contenida.

- 20 En el caso de sistemas de expresión eucariotas, es decir, en caso del uso de cultivos de células de mamífero tales como, por ejemplo, células CHO o NS0, en los últimos 15 años se ha podido conseguir un aumento en un factor de 100 de la concentración obtenible en la etapa de expresión de la proteína deseada en los cultivos celulares o en los sobrenadantes de cultivo celular. En el mismo periodo de tiempo aumentó la capacidad de unión de materiales de cromatografía que se emplean en la posterior purificación de las proteínas tan solo un factor de 3. Por este motivo existe una urgente necesidad de procedimientos de purificación optimizados, mejorados, para biomoléculas, en particular para proteínas, que se puedan llevar a cabo a gran escala industrial.

- 30 En el caso de los productos biofarmacéuticos, tales como, por ejemplo, proteínas empleadas como medicamentos, por ejemplo, anticuerpos terapéuticos, además del rendimiento del producto también tiene una importancia destacada la separación de impurezas. En este caso se puede diferenciar entre impurezas dependientes del proceso y del producto. Las impurezas dependientes del proceso incluyen componentes de las células hospedadoras, tales como proteínas y ácidos nucleicos, y proceden del cultivo celular (tales como constituyentes de medios) o del tratamiento (tales como, por ejemplo, sales o ligandos de cromatografía separados). Las impurezas dependientes del producto son variantes moleculares del producto con propiedades diferentes. A esto pertenecen formas acortadas, tales como precursores y productos de degradación hidrolítica, sin embargo también formas modificadas, producidas, por ejemplo, mediante desaminaciones, falsas glucosilaciones o puentes disulfuro enlazados incorrectamente. A las variantes dependientes del producto también pertenecen los polímeros y agregados. Se denominan contaminantes todos los demás materiales de naturaleza química, bioquímica o microbiológica que no pertenecen directamente al proceso de producción. Son contaminantes, por ejemplo, los virus que pueden aparecer, de manera indeseada, en cultivos celulares.

- 45 Las impurezas y los contaminantes conducen en el caso de los productos biofarmacéuticos a reparos en cuanto a la seguridad. Estos se intensifican cuando —como muy frecuentemente en el caso de los productos biofarmacéuticos— la administración de las proteínas terapéuticas se realiza a través de inyección o infusión directamente al torrente sanguíneo. De este modo, los componentes de la célula hospedadora pueden conducir a reacciones alérgicas o efectos inmunopatológicos. Además, las impurezas pueden llevar también a una inmunogenicidad indeseada de la proteína administrada, es decir, desencadenar una reacción inmunitaria indeseada del paciente al producto terapéutico, hasta un choque anafiláctico con riesgo para la vida. Por tanto, existe una necesidad de procesos adecuados de purificación con los que se pueda efectuar un empobrecimiento de todas las sustancias indeseadas hasta un grado inocuo.

- 55 Por otro lado, tampoco se pueden ignorar aspectos económicos en el caso de los productos biofarmacéuticos. De este modo, los procedimientos empleados de producción y purificación no deben poner en riesgo la rentabilidad del producto biofarmacéutico generado con los mismos. Además también desempeña un papel considerable el tiempo en el que se ha de establecer un nuevo proceso de purificación: además de la influencia sobre los costes, el desarrollo del proceso tiene que estar ajustado al desarrollo preclínico y clínico del medicamento. De este modo, por ejemplo, determinados estudios preclínicos, y todos los clínicos, no pueden comenzar hasta que estén disponibles cantidades suficientes del producto biofarmacéutico en una pureza suficiente.

- 65 Como punto de partida para el desarrollo de un proceso de purificación que se puede llevar a cabo también a gran escala para un anticuerpo puede servir, por ejemplo, el siguiente proceso convencional, consistente en cuatro etapas básicas: en la primera etapa se aísla la proteína diana, se concentra y estabiliza ("captura"). En la segunda

etapa se retiran los virus, en la tercera se realiza una purificación en la que se efectúa el empobrecimiento de la mayoría de las impurezas, tales como ácidos nucleicos, otras proteínas y endotoxinas. En la última etapa se eliminan las trazas, dado el caso todavía remanentes, de impurezas y contaminantes ("refinado").

5 Además de las etapas de filtración y precipitación, a este respecto, los procedimientos de cromatografía (en columna) adquieren una importancia muy alta. De este modo, por ejemplo, la "captura" incluye frecuentemente una etapa de purificación mediante cromatografía de afinidad. Por consiguiente, actualmente son conocidos numerosos procedimientos de cromatografía en columna y materiales de cromatografía que se pueden usar para ello. No obstante, con un número creciente de alternativas se tienen que llevar a cabo también ensayos previos cada vez
10 más numerosos para establecer los materiales y procedimientos óptimos en cuanto al efecto de purificación, rendimiento, actividad biológica, tiempo, costes, etc.

15 Durante el establecimiento y la optimización de un proceso de purificación además se tiene que tener en cuenta que el mismo tiene que estar hecho a medida, de manera muy individual, en cuanto a las propiedades bioquímicas y biofísicas de la molécula respectivamente a purificar (molécula diana, proteína diana) así como en cuanto a las condiciones en las que se ha obtenido el material biológico de partida. El material biológico de partida del cual se ha de aislar la molécula diana por norma general está compuesto de una mezcla muy compleja de sustancias. Para el aislamiento y la concentración de la molécula diana se aprovechan sus respectivas propiedades específicas tales como, por ejemplo, forma, tamaño, solubilidad, carga superficial, hidrofobia superficial así como su afinidad
20 bioespecífica por equivalentes de unión. Para cada nueva molécula diana, de hecho incluso con la misma molécula diana, pero con una variación de una de las etapas de trabajo precedentes (por ejemplo, un cambio de la composición del medio de cultivo para la fermentación), se tiene que optimizar de nuevo el proceso, ya que en las nuevas condiciones posiblemente ya no se puedan conseguir los mejores resultados posibles desde el punto de vista que se ha mencionado anteriormente.

25 Al mismo tiempo, gracias a la cantidad de los parámetros que se han mencionado anteriormente se potencia el número de alternativas teóricamente concebibles del proceso. En el caso de la cromatografía en columna se tienen que optimizar, por ejemplo, la disposición de la etapa de cromatografía en todo el proceso, el material de la columna, el valor de pH, el contenido de sal y el tipo de los distintos tampones de elución, la concentración de proteína al cargar la columna y muchas cosas más. Esto hace que sea prácticamente imposible desarrollar a gran escala, con una complejidad razonable de costes y tiempo, un proceso optimizado de cromatografía en columna. Por otro lado, la rentabilidad, pero también las limitaciones en cuanto a la técnica de la instalación (tales como, por ejemplo, la necesidad de emplear el menor número posible de diferentes tampones y cantidades o volúmenes en la medida de lo posible reducidos de tampón y materiales de cromatografía, mantener pequeños los volúmenes de las fracciones
30 que contienen producto así como la necesidad de mantener reducidos los tiempos del proceso y también, por ejemplo, los volúmenes de aguas residuales) precisamente requieren una optimización de este tipo en cuanto a cada etapa individual del proceso. De forma convencional, este problema se aborda variándose en ensayos previos, llevados a cabo de forma más o menos sistemática según el principio de "ensayo y error", sucesivamente un número limitado de parámetros del proceso y finalizándose estos ensayos en cuanto se haya podido establecer un proceso que básicamente "funcione". Una optimización sistemática de todos los parámetros esenciales de un proceso, dado el caso desde varios puntos de vista, por ejemplo, en cuanto al empobrecimiento de impurezas, elevados rendimientos de producto con pérdida al mismo tiempo reducida de actividad biológica y similares, con ello prácticamente no tiene lugar, o solo en una medida muy limitada. Los procesos establecidos de tal forma, por consiguiente, por norma general serán subóptimos.

45 Como alternativa se ha intentado llevar a cabo las anteriores optimizaciones mediante pequeñas columnas a escala de laboratorio (por ejemplo, pequeñas columnas con aproximadamente 1 ml de material de cromatografía). Sin embargo, en este caso se ha demostrado que con una complejidad razonable se ha podido variar a su vez solo un limitado número de parámetros, ya que las etapas de carga, lavado y elución requieren mucho tiempo incluso con estas menores dimensiones.

50 Por el documento WO2004/028658 se puede obtener otro enfoque para la optimización del proceso a escala miniaturizada. En un "procedimiento intermitente" en este caso en enfoques paralelos en placas multi-pocillo se ensayó la unión de una muestra biológica a materiales de cromatografía. Ciertamente, con este procedimiento se pueden establecer rápida y económicamente condiciones optimizadas para esta etapa de unión. Sin embargo, con esto todavía no es posible una afirmación acerca de si en las condiciones establecidas de esta manera se pueden conseguir todavía resultados óptimos en los procedimientos de cromatografía en columna a aplicar de forma obligada en condiciones a gran escala. Esta optimización del proceso se refiere también únicamente a la optimización de la etapa de la carga del material de cromatografía, es decir, solo un pequeño paso de todo el proceso.

60 Por tanto, continúa existiendo una urgente necesidad de procedimientos con los que, de forma rápida y económica, se puedan establecer y optimizar procesos de purificación de cromatografía en columna para biomoléculas, habiendo de proporcionar estos procesos resultados satisfactorios incluso en las condiciones de una producción y purificación a gran escala de la biomolécula. El objetivo de la invención es facilitar un procedimiento de este tipo.

65

Resumen de la invención

El objetivo expuesto anteriormente se resuelve mediante los procedimientos mencionados en las reivindicaciones.

5 En particular, de acuerdo con la invención se facilita un procedimiento para hallar parámetros adecuados para procedimientos de cromatografía para la separación o purificación de moléculas biológicas, llevándose a cabo a pequeña escala, por ejemplo, con un volumen de lecho de material de cromatografía entre 0,01 y 2 ml, una secuencia de etapas de etapas de equilibrado, carga, lavado y elución en un procedimiento parcialmente discontinuo (etapas con y sin suspensión del material de cromatografía). De esta manera, en una multitud de ensayos se pueden
10 variar uno o varios parámetros y a partir de los resultados de estos ensayos se pueden deducir condiciones óptimas en las que se puede llevar a cabo el procedimiento de cromatografía. Las condiciones optimizadas determinadas de este modo se pueden aplicar entonces también a procedimientos de cromatografía, en particular procedimientos de cromatografía en columna que se llevan a cabo a mayor escala.

15 Con la expresión "procedimiento parcialmente discontinuo" a este respecto se quiere decir que en una o varias de las etapas mencionadas —pero no en todas las etapas—, el material de cromatografía se suspende (se pone en suspensión), es decir, se trabaja en un procedimiento intermitente. Las etapas en las que no se realiza ninguna suspensión (puesta en suspensión) del material de cromatografía se llevan a cabo a modo de una cromatografía en columna "clásica", al aplicarse sobre un lecho de gel depositado la respectiva solución de tampón, por ejemplo, un
20 tampón de elución, sin poner en suspensión el lecho de gel, y se hace pasar el tampón de forma dirigida a través del material de columna, por ejemplo, por gravedad, centrifugación, aplicación de un gradiente de presión o similares.

De acuerdo con la invención, para resolver el objetivo que se ha mencionado anteriormente ha resultado particularmente apropiado llevar a cabo el "procedimiento parcialmente discontinuo" de tal manera que durante la
25 etapa de carga se suspende el material de cromatografía, mientras que en la etapa de elución (o, en el caso de varias etapas de elución, en las etapas de elución) se evita una suspensión del material de cromatografía y, en lugar de esto, se mueve la solución de elución de forma dirigida a través del lecho de gel depositado.

30 Cuando ahora, incluso a pequeña escala, por ejemplo, mediante el uso de entre aproximadamente 50 μ l y 2 ml de material de cromatografía de acuerdo con el procedimiento parcialmente discontinuo que se ha descrito anteriormente se establecen condiciones óptimas de carga, lavado y/o elución para el respectivo material de cromatografía y la biomolécula respectivamente a purificar (al variarse, por ejemplo, los parámetros valor de pH y/o fuerza iónica de las soluciones individuales, concentración de proteína y similares y al determinarse un resultado óptimo en vista del efecto de purificación, rendimiento y actividad biológica de la biomolécula), estas condiciones,
35 sorprendentemente, se pueden transferir de forma muy reproducible a procedimientos de cromatografía en columna incluso a mayor escala, aunque los últimos no se lleven a cabo en el procedimiento parcialmente discontinuo, sino de forma convencional como procedimientos puros de cromatografía en columna, es decir, de un modo que se puede aumentar de escala hasta escala industrial. Por lo tanto, en otras palabras, el procedimiento parcialmente discontinuo llevado a cabo a escala de miniatura se puede emplear como "modelo" para procedimientos de cromatografía en columna. La miniaturización permite una forma de trabajo sustancialmente más económica y rápida en comparación con procedimientos convencionales de optimización. Además, de acuerdo con una forma de realización preferida, los enfoques miniaturizados se pueden llevar a cabo mediante el uso de recipientes de muestras (tales como, por ejemplo, placas de filtro multipocillo) y dispositivos (pipetas multicanal, robots de pipeteado) adecuados en un mayor número en paralelo y a este respecto se pueden variar al mismo tiempo varios
45 parámetros. Como resultado se obtiene, por ello, una gran cantidad de datos, a partir de los cuales se pueden establecer las condiciones de cromatografía en columna optimizadas simultáneamente en vista de todos los parámetros decisivos para una biomolécula concreta a purificar. Por tanto, un procedimiento de optimización de este tipo se puede llevar a cabo de forma económica y rápida y posibilita avances decisivos en relación con la selección óptima de parámetros adecuados para procedimientos de separación mediante cromatografía. Con ello, este
50 procedimiento aporta una contribución decisiva a la mejora de procedimientos de purificación para biomoléculas y, por tanto, también a la calidad y rentabilidad de los productos en los que se usa una biomolécula de este tipo.

Breve descripción de las figuras

55 La Fig. 1 muestra un diagrama de flujo en el que está representado un procedimiento parcialmente discontinuo de acuerdo con una forma de realización particularmente preferida de la invención.

La Fig. 2 muestra, esquemáticamente, una estructura de ensayo en un robot. Se muestran: cubeta con solución de etanol (1), recipientes de muestra con soluciones de proteína (2), recipientes de muestra con suspensiones de los materiales de cromatografía (3), placas de microtitulación con tampones de equilibrado, lavado y elución (4), placa de filtro de microtitulación (5) y reserva de puntas de pipetas (6).
60

La Fig. 3 muestra, gráficamente, los resultados de los ensayos expuestos en el Ejemplo 3, estando resumidos en las 8 figuras Fig. 3.1 a Fig. 3.8 los resultados de una "identificación de unión" con 8 materiales de cromatografía distintos y en las 4 figuras Fig. 3.9 a Fig. 3.12, los resultados de una "identificación de
65

elución" con 4 materiales de cromatografía distintos. Están aplicadas, respectivamente, las partes porcentuales de la cantidad empleada en total de proteína por cavidad en las soluciones de paso o los eluatos en la etapa de carga ("solución de paso"), la etapa de lavado ("lavado1"), las tres etapas de elución "Elu1" a "Elu3") y la cantidad total de proteína recuperada ("proteína total"). Dentro de tal grupo mostrado en el diagrama de 8 barras, las barras individuales reproducen los resultados con diferentes concentraciones de sal y pH, indicados en la leyenda.

La Fig. 4 muestra, como comparación, el perfil de elución obtenido en el Ejemplo 4 de una purificación mediante cromatografía en columna de la proteína mAb1 (línea continua: concentración de proteína; línea discontinua: conductividad) y la concentración de mAb1 en una identificación en placas de filtro multipocillo en condiciones correspondientes (barras).

La Fig. 5 muestra, gráficamente, los resultados de los ensayos expuestos en el Ejemplo 5, estando mostrados en las figuras Fig. 5.1 a Fig. 5.4 los resultados de la identificación con 4 materiales de cromatografía distintos. Están aplicadas, respectivamente, las partes porcentuales de la cantidad empleada en total de proteína por cavidad en las soluciones de paso o los eluatos en la etapa de carga ("solución de paso"), la etapa de lavado ("lavado1"), las tres etapas de elución ("Elu1" a "Elu3") y la cantidad total de proteína recuperada ("proteína total"). Dentro de cada grupo de 8 barras, las barras individuales reproducen los resultados a diferentes concentraciones de sal indicadas en la leyenda.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la invención se facilita un procedimiento para hallar parámetros adecuados para procedimientos de cromatografía para la separación (purificación) de moléculas biológicas, incluyendo el procedimiento de cromatografía (una o varias) etapas de equilibrado, (una o varias) etapas de carga, (una o varias) etapas de lavado y (una o varias) etapas de elución, caracterizado por que la secuencia de etapas de etapas de equilibrado, carga, lavado y elución se lleva a cabo en el procedimiento parcialmente discontinuo. Preferiblemente incluye al menos la etapa de carga la suspensión del material de cromatografía y al menos en una etapa de elución se omite una suspensión del material de cromatografía. De acuerdo con la invención, en la etapa de equilibrado (o en las etapas de equilibrado) se suspende el material de cromatografía. De acuerdo con dos otras formas de realización alternativas de la invención, en la o en las etapas de lavado se suspende o no se suspende el material de cromatografía. En todas estas formas de realización se usa el procedimiento parcialmente discontinuo que consiste en llevar a cabo una parte del procedimiento —al menos la etapa de carga— con suspensión del material de cromatografía (es decir, en el "procedimiento intermitente"), mientras que en otra parte —al menos en el caso de la elución de la biomolécula— a modo de una cromatografía en columna el material de cromatografía no se suspende, sino que el tampón de elución se aplica sobre el lecho de gel no suspendido y a continuación mediante centrifugación, aplicación de un gradiente de presión o similares se obtiene el eluato.

Por "material de cromatografía" se entiende todos los materiales que se pueden usar convencionalmente para la cromatografía en columna. Estos se pueden clasificar en materiales para:

- cromatografía de afinidad,
- cromatografía de intercambio iónico, en particular cromatografía de intercambio aniónico e intercambio catiónico,
- cromatografía de interacción hidrófoba,
- cromatografía de "fase inversa",
- cromatografía de hidroxapatita,
- cromatografía de "inducción de carga hidrófoba" y
- cromatografía en "modo mixto"

sin que la invención esté limitada a estos grupos o a los materiales mencionados expresamente a continuación.

Los materiales para la cromatografía de afinidad contienen un ligando unido a un material de soporte que causa la unión selectiva y específica de la biomolécula a purificar al material de cromatografía. Los ligandos usados frecuentemente en la purificación de anticuerpos son proteína A, una proteína de la pared celular de *Staphylococcus aureus*, así como distintas variantes y derivados de la misma.

Como grupos funcionales para materiales de cromatografía adecuados para la cromatografía de intercambio aniónico se pueden usar, por ejemplo, el grupo hidroxipropildietilaminoetilo cuaternario, el grupo trimetilaminoetilo cuaternario o el grupo dietilaminoetilo. Son grupos adecuados para la cromatografía de intercambio catiónico, por ejemplo, el grupo sulfometilo, el grupo sulfopropilo y el grupo carboximetilo.

En la cromatografía de interacción hidrófoba se pueden usar, por ejemplo, ligandos de alquilo y arilo tales como, por ejemplo, ligandos de éter y metilo (interacción más débil con proteínas) o ligandos de butilo, fenilo y octilo (interacción más fuerte).

En la cromatografía de fase inversa se usan asimismo ligandos de alquilo o arilo, siendo la densidad de ligando típicamente mayor que en la cromatografía de interacción hidrófoba.

5 Para la cromatografía en modo mixto y de inducción de carga hidrófoba se usan en particular ligandos que, dependiendo del valor de pH, establecen diferentes interacciones con la biomolécula (tales como, por ejemplo, MBI HyperCel® Sorbent y MEP HyperCel® Sorbent de BioSeptra).

10 Las soluciones de tampón de equilibrado, soluciones de ensayo, soluciones de lavado y soluciones de elución (denominadas en lo sucesivo de forma general "soluciones de tampón") pueden ser soluciones a base de, por ejemplo, tampón fosfato, Tris, acetato, citrato o glicina.

15 La puesta en suspensión del material de cromatografía se realiza, por ejemplo, mediante agitación (con alta frecuencia) de los recipientes de muestra (por ejemplo, con empleo de un agitador mecánico) o mediante pipeteado hacia arriba y abajo del material de cromatografía.

20 En particular en la etapa de carga puede ser necesario, después de la adición de la solución de ensayo que contiene la biomolécula al material de cromatografía, añadir una etapa de incubación. En caso de una incubación demasiado corta del material de cromatografía con la solución de ensayo puede aparecer el problema de que la biomolécula no se haya unido por completo al material de cromatografía antes de que se sustituya la solución de ensayo por la solución de lavado. En caso de un tiempo de incubación demasiado largo, en muchas biomoléculas existe el peligro de que comience una desnaturalización de la biomolécula. Dependiendo del tipo de la biomolécula, del tampón de ensayo y del material de cromatografía, por tanto, se ha de seleccionar la duración de la incubación entre los extremos que se han mencionado anteriormente. Frecuentemente no se supera la duración de incubación óptima establecida de 120 min. Preferiblemente se incuba no más de 60 min. Son particularmente preferidos tiempos de incubación inferiores a 30 min.

25 En el sentido de la presente invención, la "etapa de lavado" es la etapa que sigue a la carga del material de cromatografía con la biomolécula. Dependiendo del planteamiento del problema puede pretenderse causar, ya en esta etapa, una elución de la biomolécula. En este caso, la etapa de lavado ya representa una etapa de elución, es decir, la etapa de lavado y elución coinciden.

30 Dependiendo del planteamiento del problema, la solución de ensayo en la etapa de carga puede contener una biomolécula definida o incluso una mezcla de biomoléculas. Dependiendo del planteamiento, en el caso de la biomolécula definida puede tratarse, por ejemplo, de una proteína que se ha de purificar en el proceso a establecer y a optimizar a gran escala, o también de una impureza definida tal como, por ejemplo, agregados de la proteína a purificar o de proteína A (para examinar la capacidad de separación de "proteína A lixiviada" liberada, dado el caso, de una columna de proteína A en una etapa previa de purificación). La mezcla puede ser, por ejemplo, un lisado celular, dado el caso después de etapas previas de centrifugación y/o filtración tal como, por ejemplo, una mezcla que sirve posteriormente a gran escala como material de partida para la purificación de proteínas de célula hospedadora (HCP) con proteína diana sobreexpresada.

35 Como se ha mencionado al principio, el procedimiento parcialmente discontinuo que se ha descrito anteriormente, llevado a cabo a pequeña escala, puede servir para establecer condiciones de cromatografía en las que, entonces, suministrará resultados óptimos también el procedimiento de purificación de cromatografía en columna correspondiente, a llevar a cabo a gran escala. Se puede establecer habitualmente si las condiciones seleccionadas respectivamente, tales como el tipo del material de cromatografía, el tipo del tampón, la fuerza iónica/conductividad, valor de pH, etc., suministran un resultado más o menos bueno al analizar las soluciones de paso al menos de la etapa de elución o de las etapas de elución con respecto a la cantidad y la calidad (por ejemplo, actividad biológica todavía presente) de la biomolécula eluída. Preferiblemente además se recoge también la solución de paso de la etapa de carga y de la etapa de lavado (o de las etapas de lavado) y se analiza de la misma manera para obtener, de este modo, una imagen completa acerca de las propiedades de unión de la biomolécula en estas etapas en las condiciones respectivamente seleccionadas. El tipo de tratamiento y análisis de las soluciones de paso y los eluatos depende del tipo de la cromatografía y el material de muestra, es decir, de la biomolécula o de la mezcla de biomoléculas. En el caso de una cromatografía de afinidad de proteína A y la carga de la columna con una mezcla de HCP y proteína diana (inmunoglobulina) sobreexpresada, por ejemplo será de interés qué tamaño tiene la parte de la inmunoglobulina añadida en la etapa de carga con la solución de ensayo, que se ha unido al material de cromatografía (es decir, que no se puede volver a encontrar en la solución de paso de la etapa de carga), qué cantidad de inmunoglobulina y de impurezas aparece en la o en las etapas de lavado en la solución de paso y en qué cantidad y pureza se puede encontrar de nuevo la inmunoglobulina en la o en las etapas de elución en el eluato y qué parte presenta todavía la actividad biológica deseada. Estas determinaciones se pueden efectuar de manera convencional, por ejemplo, mediante métodos de espectroscopía y otros métodos de determinación de proteínas. El contenido de impurezas se puede hacer visible y cuantificarse, por ejemplo, a través de electroforesis en gel de SDS o procedimientos de isoelectroenfoque.

65 De acuerdo con una forma de realización particular de la invención, en una cromatografía de intercambio iónico se optimizan condiciones de carga y elución en ensayos independientes (identificación de unión y elución) y en

cualquier caso en la identificación de elución se prevén varias etapas de elución, cambiando con cada etapa de forma escalonada, por ejemplo, la concentración de sal.

5 En una forma de realización preferida se llevan a cabo las etapas de equilibrado, carga, lavado y elución en varios enfoques en paralelo. En este caso, para el establecimiento de las condiciones óptimas de cromatografía de forma apropiada estas condiciones se varían en los enfoques individuales, de tal manera que a partir de los resultados de la purificación respectivos que se pueden conseguir en enfoques llevados a cabo en paralelo se pueden deducir las condiciones de cromatografía óptimas para la respectiva biomolécula y/o material de cromatografía. La realización en enfoques paralelos se puede realizar mediante el uso de una placa de filtro multipocillo en la que están previstos múltiples receptáculos de alojamiento de muestra, en los que se alojan el material de cromatografía y las soluciones de tampón (tales como, por ejemplo, las soluciones de tampón de equilibrado, soluciones de ensayo que contienen, dado el caso, una biomolécula, soluciones de lavado y soluciones de elución), estando terminados estos receptáculos en el lado del fondo con un material con propiedad filtrante que permite la salida de la solución de tampón, pero no del material de cromatografía. Tales placas de filtro multipocillo o de microtitulación están disponibles, por ejemplo, con el nombre comercial Captiva® de Varian® (96 cavidades, tamaño de poro 0,45 µm), MultiScreen® de Millipore® (96 cavidades, tamaños de poros 0,22 µm, 0,45 µm y 0,65 µm) y Silent Screen® de Nunc® (96 cavidades y un tamaño de poro de 0,45 µm). Las soluciones de cromatografía y soluciones de tampón se pueden pipetear con una pipeta multicanal convencional o un robot de pipeteado (por ejemplo, Freedom Evo 150® de Tecan®) en los receptáculos de alojamiento de muestra que se encuentran sobre la placa.

20 Los volúmenes de los materiales de cromatografía y soluciones de tampón pipeteados en las cavidades pueden variar y, con el uso de una de las placas de filtro que se han mencionado anteriormente con 96 cavidades, se encuentran preferiblemente en el intervalo de 0,01 a 2 ml, más preferiblemente en el intervalo de 0,05 a 2 ml. Con la carga inicial de las placas de filtro con material de cromatografía ha resultado ventajoso enjuagar las placas de filtro en primer lugar con una solución de etanol, por ejemplo al 20 % o al 10 %, y añadir a continuación el material de cromatografía como puesta en suspensión del 1 al 60 % (p/v) en solución de etanol al 20 % o al 10 %.

30 La realización del procedimiento de acuerdo con la invención en enfoques paralelos permite la optimización simultánea de varios parámetros de cromatografía en columna y, por tanto, abre la posibilidad de desarrollar, en un tiempo muy corto y empleando reducidas cantidades de material, un proceso de cromatografía en columna que, en las condiciones establecidas de este modo, proporcionará un resultado excelente de purificación incluso a gran escala. De este modo se pueden facilitar mejores procesos y se puede ahorrar un costoso tiempo de desarrollo y material caro (material de cromatografía, biomoléculas, etc.).

35 De acuerdo con una forma de realización muy particularmente preferida se lleva a cabo el procedimiento de acuerdo con la siguiente secuencia de etapas (véase también la Fig. 1):

- (a) una puesta en suspensión de un material de cromatografía se pone en múltiples cavidades (receptáculos de alojamiento de muestra) de una placa de filtro multipocillo,
- 40 (b) en las cavidades provistas de la puesta en suspensión se genera un lecho de gel húmedo al retirarse el sobrenadante sobre el material de cromatografía mediante centrifugación o mediante aplicación de una diferencia de presión,
- (c) para el equilibrado del material de cromatografía que se encuentra en las cavidades se añade al lecho de gel húmedo una solución de tampón de equilibrado y el lecho de gel se pone en suspensión y opcionalmente se
- 45 incuba durante un periodo de tiempo determinado con la solución (etapa de equilibrado),
- (d) correspondientemente a la etapa (b) se genera un lecho de gel húmedo,
- (e) opcionalmente, las etapas (c) y (d) se repiten varias veces, en particular una vez, dos veces o tres veces,
- (f) para la carga del material de cromatografía se añade al lecho de gel una solución de ensayo que contiene al menos una biomolécula y se pone en suspensión el lecho de gel y se incuba opcionalmente con la solución de
- 50 carga (etapa de carga),
- (g) correspondientemente a la etapa (b) se genera un lecho de gel húmedo,
- (h) para el lavado del material de cromatografía se añade al lecho de gel una solución de lavado, poniéndose opcionalmente en suspensión el lecho de gel y volviéndose a incubar opcionalmente (etapa de lavado),
- (i) correspondientemente a la etapa (b) se genera un lecho de gel húmedo,
- 55 (k) opcionalmente, las etapas (h) e (i) se repiten varias veces, en particular una vez, dos veces o tres veces, pudiendo presentar las soluciones de lavado usadas composiciones iguales o diferentes y poniéndose en suspensión o no poniéndose en suspensión a este respecto opcionalmente el lecho de gel,
- (l) para la elución de la biomolécula se añade al lecho de gel una solución de elución sin causar, a este respecto, una puesta en suspensión del lecho de gel (etapa de elución), (m) correspondientemente a la etapa (b) se
- 60 genera un lecho de gel húmedo y en este caso se recoge el eluato,
- (n) opcionalmente, las etapas (l) y (m) se repiten varias veces, en particular una vez, dos veces o tres veces, pudiendo presentar las soluciones de elución usadas composiciones iguales o diferentes y
- (o) los eluatos recogidos se analizan.

Después del análisis de los eluatos y de las otras soluciones de paso asimismo dado el caso recogidas, en relación con concentración y actividad biológica (tal como, por ejemplo, propiedades de unión específicas) con procedimientos convencionales, el experto estará en disposición de reconocer qué enfoque ha proporcionado los mejores resultados y, de este modo, puede deducir en qué condiciones se tienen que llevar a cabo las etapas individuales para conseguir resultados óptimos.

La invención se continúa explicando a continuación mediante los ejemplos, sin que el objeto de la invención quede limitado a estos ejemplos.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: instrucción general de trabajo para la realización del procedimiento de acuerdo con una forma de realización de la invención (realización automatizada en varios enfoques paralelos)

15 Una placa de filtro multipocillo se enjuaga en una primera etapa con solución de etanol al veinte por ciento. Para esto se carga la solución en la placa y la misma se centrifuga, recogándose la solución de etanol separada de este modo mediante centrifugación en una placa de microtitulación subyacente y desechándose a continuación. A continuación se carga la placa de filtro con las respectivas suspensiones de los materiales de cromatografía. En caso necesario, adicionalmente se puede añadir más solución de etanol al veinte por ciento sobre las suspensiones. 20 Mediante centrifugación se sedimenta el material y el líquido se retira hasta que los materiales no lleguen a estar secos. También se desecha la solución de paso. A continuación se realiza el equilibrado del material de cromatografía (para esto compárese también con la Fig. 1). Para esto se pone el tampón, que se corresponde con las condiciones de equilibrado, sobre el material de cromatografía. Después se incubaba la placa para el entremezclado de tampón y material sobre el agitador de placas de microtitulación con las máximas revoluciones y a 25 continuación el tampón se vuelve a separar mediante centrifugación y se desecha. Esta etapa se repite una vez de acuerdo con el esquema ilustrativo de visión general en la Fig. 1.

En la posterior etapa de carga se ponen las soluciones preparadas de proteína, en las que previamente se han ajustado los mismos valores de pH y contenidos de sal que durante el equilibrado, sobre el material de cromatografía y se incubaba sobre el agitador de placas de microtitulación. El filtrado forma la solución de paso (FT). 30 En las etapas de lavado y elución posteriores se pone tampón ajustado correspondientemente (véase, por ejemplo, los Ejemplos 3 y 5) sobre los materiales de cromatografía. Opcionalmente también en las etapas de lavado a su vez se puede agitar e incubar, mientras que en la elución se prescinde de una agitación de este tipo ("procedimiento parcialmente discontinuo"). La fase líquida respectivamente se separa mediante centrifugación. Los filtrados de las 35 etapas de lavado se proveen de "W" o "lavado" y un número consecutivo, los de las etapas de elución de forma análoga de "E" o "Elu" y un número consecutivo. Al final respectivamente 150 µl de todos los filtrados no desechados para la determinación fotométrica del contenido a 280 nm se transfieren a placas de microtitulación adecuadas.

40 Preferiblemente, durante el equilibrado, la carga y el lavado respectivamente se agita y se incubaba. En la elución, que se lleva a cabo típicamente (véase, por ejemplo, Ejemplos 3 y 5) con cambio del valor de pH y/o del contenido de sal, por el contrario se pone el tampón de elución cuidadosamente sobre los materiales de cromatografía y sin mezcla e incubación se centrifuga de inmediato.

45 La Tabla 1 muestra un desarrollo típico de las etapas que se han mencionado anteriormente, incluyendo indicaciones ilustrativas con respecto a tiempos típicos de incubación. A este respecto, el tampón de lavado se corresponde, en relación con el valor de pH y el contenido de sal, con el tampón de equilibrado. Los volúmenes y los ajustes de centrifugación están ajustados en el presente caso a la placa de filtro multipocillo Silent Screen® de Nunc®. 2200 rpm (revoluciones por minuto) se corresponden con una aceleración centrífuga relativa de 1012 g, 50 1200 rpm se corresponden con 301 g. La incubación se realiza en el agitador de placas de microtitulación con el máximo número de revoluciones, esto son aproximadamente 1400 rpm:

Tabla 1:

Etapa	Adición de líquido		Tiempo de incubación	Centrifugación		Frecuencia
	Volumen	Tipo		Número de revoluciones	Duración	
Enjuagado	350 µl	Solución de etanol al 20 %	-	2200 rpm	1 minuto	1x
Relleno con medios de cromatografía	100 µl	Suspensión				
	100 µl	Solución de etanol al 20 %	-	1200 rpm	1 minuto	1x
Equilibrado	200 µl	Tampón de equilibrado	5 minutos	1200 rpm	1 minuto	2x
Carga	200 µl	Solución de proteína	21 minutos	1200 rpm	1 minuto	1x
Lavado	200 µl	Tampón de lavado	9 minutos	1200 rpm	1 minuto	0-4x
Elución	200 µl	Tampón de elución	-	1200 rpm	1 minuto	0-5x

Para la realización automatizada en varios enfoques paralelos se emplea preferiblemente un robot de pipeteado. En la Fig. 2 está mostrada una disposición típica que se puede emplear en este tipo de realización. A este respecto, la cubeta (1) contiene la solución de etanol que se ha mencionado anteriormente. Las soluciones de ensayo que contienen la biomolécula, ajustadas a valores de pH y concentraciones de sal adecuados y las suspensiones de los materiales de cromatografía se encuentran en los recipientes de muestra (2) y (3). En la posición (4) están previstas placas de microtitulación/DWP que contienen el tampón de equilibrado, lavado y elución. Al lado de esto está dispuesta la placa de filtro multipocillo (5).

Ejemplo 2: comparación de dos formas de realización del "procedimiento parcialmente discontinuo" con un procedimiento discontinuo (por completo) (procedimiento "intermitente").

El procedimiento parcialmente discontinuo se comparó con un procedimiento intermitente. En el último, en todas las etapas se agitó e incubó. En el procedimiento parcialmente discontinuo de acuerdo con la invención, por el contrario, en las etapas de equilibrado y carga se agitó, incubó y centrifugó (o se retiró de otro modo el sobrenadante del material de cromatografía), pero en las etapas de elución se centrifugó de inmediato (o se retiró de otro modo el sobrenadante del material de cromatografía). De acuerdo con una forma de realización de la invención, en la etapa de lavado asimismo se agitó e incubó, de acuerdo con una segunda forma de realización también en la etapa de lavado solo se aplicó el tampón de lavado cuidadosamente y se separó mediante centrifugación/retiró de inmediato.

Para poder valorar qué procedimiento proporciona las mejores informaciones acerca de condiciones adecuadas de cromatografía, se ensayaron los procedimientos que se han mencionado anteriormente mediante la purificación de un anticuerpo mediante cromatografía de interacción hidrófoba. Como material de cromatografía se usó fenil Sepharose 6 FF. El anticuerpo usado se une; cuando la conductividad de un tampón TRIS 50 mM con pH = 6,5 con sulfato de amonio se aumenta a 120 mS·cm⁻¹. Por tanto, el tampón de equilibrado y de lavado así como la solución de carga que contenía proteínas se ajustaron a estas condiciones. El tampón de elución contenía menos sulfato de amonio, su conductividad ascendía a 50 mS·cm⁻¹. El tiempo de incubación durante el equilibrado ascendió respectivamente a cinco minutos, durante la carga a 21 minutos y durante el lavado, dado el caso, a nueve minutos. Los índices de recuperación en las fracciones recogidas (solución de paso en carga: FT; etapas de lavado: W1 a W3, etapas de elución: E1 a E4) están representados en la Tabla 2.

Tabla 2:

Fracción	FT	W1	W2	W3	E1	E2	E3	E4	Suma
Procedimiento parcialmente discontinuo etapas de lavado con puesta en suspensión:									
Valor medio	2,4 %	2,8 %	2,4 %	2,2 %	42,0 %	17,6 %	8,7 %	5,2 %	83,2 %
Desviación típica	0,7 %	0,4 %	0,4 %	0,3 %	1,9 %	0,8 %	0,4 %	0,2 %	
Procedimiento parcialmente discontinuo/ etapas de lavado sin puesta en suspensión:									
Valor medio	6,9 %	3,6 %	1,3 %	0,4 %	33,3 %	19,1 %	8,5 %	5,2 %	78,2 %
Desviación típica	4,0 %	1,5 %	0,4 %	0,1 %	3,1 %	1,5 %	1,0 %	0,7 %	
Procedimiento discontinuo / procedimiento intermitente:									
Valor medio	2,2 %	2,8 %	2,0 %	1,5 %	30,2 %	16,4 %	7,7 %	3,8 %	66,5 %
Desviación típica	0,3 %	1,2 %	0,2 %	0,1 %	4,0 %	3,4 %	2,5 %	1,3 %	

Como se puede ver claramente en la Tabla 2, el índice de recuperación en el procedimiento parcialmente discontinuo con el 83,2 % o el 78,2 % es considerablemente mayor que en el procedimiento intermitente, en el que se han podido encontrar de nuevo solo aproximadamente dos tercios del material. Además, este ensayo muestra que en el procedimiento intermitente, en particular en las etapas de elución, la reproducibilidad es claramente peor que en el procedimiento parcialmente discontinuo (mayores desviaciones típicas). Desde este punto de vista, el procedimiento parcialmente discontinuo de acuerdo con la forma de realización con suspensión en la etapa de lavado proporciona resultados particularmente buenos. Una reproducibilidad fiable de los resultados es una condición importante para la capacidad de transferencia de las condiciones óptimas establecidas de este modo de cromatografía a etapas de proceso de cromatografía en columna llevadas a cabo a mayor escala.

Ejemplo 3: Uso del procedimiento de acuerdo con la invención para la identificación de materiales adecuados de intercambio catiónico y condiciones adecuadas de cromatografía en la purificación de un anticuerpo monoclonal

Durante la preparación de anticuerpos en cultivos celulares eucariotas, la proteína diana se encuentra típicamente como proteína secretada al medio en una mezcla compleja con otras biomoléculas. Para el anticuerpo monoclonal mAb1 se llevó a cabo la siguiente identificación para determinar las condiciones óptimas para la concentración del anticuerpo mediante un intercambiador catiónico:

Identificación de unión:

Dos ciclos de identificación sirvieron para establecer los materiales óptimos de cromatografía y las condiciones de unión respectivamente ideales (identificación de unión). Se ensayaron los siguientes materiales de cromatografía:

- Ciclo 1: SP Sepharose®, Toyopearl® SP 650 M, Toyopearl® SP 550 C, EMD Fractogel® S03
- Ciclo 2: CM Ceramic Hyper DLS®, S Ceramic Hyper DF®, Poros 50 HS®, CM Sepharose FF.

En este caso, SP y HS se refieren al grupo sulfopropilo como grupo funcional que está acoplado covalentemente a la matriz de base del material de cromatografía, S03 al grupo sulfoisobutilo, CM al grupo carboximetilo, S al grupo ácido sulfónico.

Las soluciones de proteína empleadas, es decir, los sobrenadantes de cultivo celular obtenidos después de la fermentación de las células de expresión mediante centrifugación y filtración, se ajustaron a las condiciones indicadas en la Tabla 3.1:

Tabla 3.1: condiciones para los combinados de carga (soluciones de ensayo que contienen mAb1) en el ciclo 1 y 2

	Combinado 1	Combinado 2	Combinado 3	Combinado 4	Combinado 5	Combinado 6	Combinado 7	Combinado 8
pH	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	7,0	7,5	5,0
Volumen [ml]	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
Contenido [mg/ml]	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Se usaron suspensiones al 10 % de los materiales de cromatografía en solución de etanol al 20 % y se generaron 0,05 ml de lecho de gel. La identificación se llevó a cabo en el procedimiento parcialmente discontinuo que se ha descrito anteriormente (con suspensión en la etapa de lavado). Después de dos etapas de equilibrado siguió la carga con las soluciones de proteína (soluciones de ensayo que contenían mAb1; véase la Tabla 3.1) y una etapa de lavado. A continuación se eluyó en tres etapas. Los tampones se dispusieron, tal como está indicado en las Tablas 3.2 y 3.3, respectivamente en dos placas de pocillos profundos (Deep Well) (placas multipocillo con 2 ml de cabida; denominadas en lo sucesivo también "DWP") según la estructura de ensayo descrita en el Ejemplo 1. De cada condición se realizó una triple determinación que se agruparon en la posterior determinación de las concentraciones de anticuerpo mediante rProtA-HPLC (cromatografía de afinidad analítica mediante proteína A recombinante acoplada a una matriz de base).

Tabla 3.2: condiciones de tampón y disposición en la placa de pocillos profundos 1

Equilibrado 1 (DWP1.1 columna 1-4)	Equilibrado 2 (DWP1.2 columna 5-8)	Lavado (DWP1.3 columna 9-12)
	acetato 50 mM pH 4,0	
	acetato 50 mM pH 4,5	
	acetato 50 mM pH 5,0	
	fosfato 50 mM pH 5,5	
	fosfato 50 mM pH 6,0	
	Tris 50 mM pH 6,5	
	Tris 50 mM pH 7,0	
	acetato 50 mM pH 5,0	

Tabla 3.3: condiciones de tampón y disposición en la placa de pocillos profundos 2

Elución 1 (DWP2.1 columna 1-4)	Elución 2 (DWP2.2 columna 5-8)	Elución 3 (DWP2.3 columna 9-12)	Valor de pH
Tris 50 mM NaCl 0,3 M	Tris 50 mM NaCl 0,6 M	Tris 50 mM NaCl 1 M	pH 9,0

5 Las concentraciones de mAB1 halladas en las soluciones de paso o los eluatos en las fracciones individuales están representadas en las Figuras 3.1 a 3.8. A causa del encuentro, del análisis de SDS-PAGE llevado a cabo con fracciones seleccionadas y el comportamiento de unión se seleccionaron las siguientes matrices de cromatografía para una identificación de elución (identificación de condiciones óptimas de elución): SP Sepharose® FF, Toyopearl® SP 650 M, Poros® 50 HS, EMD Fractogel® S03.

10 *Identificación de elución:*

En la identificación de elución se ajustaron los sobrenadantes del cultivo acelulares que contenían el mAb1, tal como se muestra en la Tabla 3.4, a los valores de pH 5,0 y 6,5:

15 Tabla 3.4: condiciones para los combinados de carga (soluciones de ensayo que contienen mAb1) en el ciclo 1 y 2

	Combinado 1	Combinado 2	Combinado 3	Combinado 4	Combinado 5	Combinado 6	Combinado 7	Combinado 8
pH	5,0	5,0	5,0	5,0	6,5	6,5	6,5	6,5
Volumen [ml]	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
Contenido [mg/ml]	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Para las etapas de equilibrado, lavado y elución se rellenaron los tampones indicados en la Tabla 3.5 y 3.6 en las placas de pocillos profundos:

20 Tabla 3.5: condiciones de tampón y disposición en la placa de pocillos profundos 1

Equilibrado 1 (DWP1.1 columna 1-4)	Equilibrado 2 (DWP1.2 columna 5-8)	lavado (DWP1.3 columna 9-12)
		acetato 50 mM pH 5,0
		acetato 50 mM pH 5,0
		acetato 50 mM pH 5,0
		acetato 50 mM pH 5,0
		fosfato 50 mM pH 6,5
		fosfato 50 mM pH 6,5
		fosfato 50 mM pH 6,5
		fosfato 50 mM pH 6,5

Tabla 3.6: condiciones de tampón y disposición sobre la placa de pocillos profundos 2

Elución 1 (DWP2.1 columna 1-4)	Elución 2 (DWP2.2 columna 5-8)	Elución 3 (DWP2.3 columna 9-12)	Valor de pH
fosfato 50 mM, NaCl 50 mM	+ NaCl 100 mM	+ NaCl 200 mM	6,0
fosfato 50 mM, NaCl 50 mM	+ NaCl 100 mM	+ NaCl 200 mM	6,5
Tris 50 mM, NaCl 50 mM	+ NaCl 100 mM	+ NaCl 200 mM	7,0
Tris 50 mM, NaCl 50 mM	+ NaCl 100 mM	+ NaCl 200 mM	7,5
fosfato 50 mM, NaCl 50 mM	+ NaCl 100 mM	+ NaCl 200 mM	6,0
fosfato 50 mM, NaCl 50 mM	+ NaCl 100 mM	+ NaCl 200 mM	6,5
Tris 50 mM, NaCl 50 mM	+ NaCl 100 mM	+ NaCl 200 mM	7,0

Tris 50 mM, NaCl 50 mM	+ NaCl 100 mM	+ NaCl 200 mM	7,5
------------------------	---------------	---------------	-----

En las figuras Fig. 3.9 a Fig. 3.12 están representadas gráficamente las partes porcentuales de la cantidad total aplicada de mAb1 por pocillo en las etapas individuales en las condiciones indicadas. Con respecto al índice de recuperación de la proteína diana y concentraciones de sal ventajosamente bajas (minimización deseada en vista, por ejemplo, de los costes con transferencia a escalas industriales) se identificaron como condiciones adecuadas la carga a pH 5 y la elución a pH 6,5 y sal 0,05 M en EMD Fractogel® S03 (véase Fig. 3.12, B10-B12).

Ejemplo 4: capacidad de correlación de los resultados del procedimiento de identificación de acuerdo con la invención en placas de filtro de micropocillos con los resultados de ensayos en columna convencionales

Con aplicación de las condiciones optimizadas establecidas en el Ejemplo 3 se llevaron a cabo ensayos de cromatografía en columna con 1 ml de volumen de lecho. El caudal ascendió a 0,5 ml/min. La carga de la columna se realizó con una concentración de sal de NaCl 0 M a pH 5. La etapa de lavado se realizó en las mismas condiciones. Para la elución se usó un gradiente escalonado de NaCl 0 / 0,05 / 0,1 / 0,2 M. Este reproduce las condiciones de la identificación en la placa de filtro de micropocillos en la que se había usado EMD Fractogel® S03 y la etapa de unión a pH 5 y las etapas de elución se habían llevado a cabo a pH 6,5.

En la Fig. 4 están superpuestos el perfil de elución de la cromatografía en columna llevada a cabo de la anterior manera (línea continua: concentración de proteína; línea discontinua: conductividad) y las partes porcentuales de la cantidad total aplicada de mAb1 por pocillo como se habían obtenido en identificaciones de acuerdo con la invención en placas de filtro multipocillo en las condiciones correspondientes en el Ejemplo 3 (barras). A partir del análisis posterior de las soluciones de paso y los eluatos mediante SDS-PAGE se pudo comprobar que la distribución del producto de mAb1 en los picos coincide con la de la identificación, es decir, que estaba presente mAb1 concentrado en los correspondientes eluatos. Esto demuestra la capacidad de transferencia de las condiciones de cromatografía optimizadas establecidas de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención a procedimientos en los que se usan columnas de cromatografía.

Ejemplo 5: identificación con respecto al comportamiento de un anticuerpo monoclonal en matrices de interacción hidrófoba en distintas condiciones de cromatografía

Para este ejemplo se usó un anticuerpo mAb2 ya concentrado en una primera etapa mediante cromatografía de afinidad de rProteínaA. El objetivo de la identificación era constatar el comportamiento de mAb2 con respecto a matrices de interacción hidrófoba como materiales de cromatografía, para decidir si en el proceder posterior se han de examinar condiciones de unión o de paso con respecto al anticuerpo mAb2, es decir, si se puede conseguir un efecto adicional de purificación al dejar que el anticuerpo se una a la columna y dejando que las impurezas eluyan de la mejor forma posible, o dejando eluir el anticuerpo y efectuando el empobrecimiento en cuanto a impurezas mediante su unión al material de la columna.

Se usaron los siguientes materiales de cromatografía: fenil Sepharose® HP, fenil Sepharose® FF, Toyopearl® fenilo y Toyopearl® butilo. Las soluciones de proteína empleadas se ajustaron a las condiciones indicadas en la Tabla 5.1:

Tabla 5.1: condiciones para los combinados de carga (soluciones de ensayo que contenían mAb2) en el ciclo 1 y 2

	Combinado 1	Combinado 2	Combinado 3	Combinado 4	Combinado 5	Combinado 6	Combinado 7	Combinado 8
pH	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
Sulfato de amonio (AS)	0 M	0,1 M	0,26 M	0,3 M	0,4 M	0,6 M	0,8 M	1 M
Volumen [ml]	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
Contenido [mg/ml]	1,64	1,64	1,64	1,64	1,64	1,64	1,64	1,64

Se usaron suspensiones al 10 % de los materiales de cromatografía en solución de etanol al 20 % y de este modo se generó un lecho de gel de 0,05 ml. Se trabajó según el procedimiento parcialmente discontinuo. Al igual que en el Ejemplo 3, después de dos etapas de equilibrado siguió la carga con solución de ensayo que contenía proteína (véase la Tabla 5.1) y una etapa de lavado (con suspensión del material de cromatografía). A continuación se eluyó en tres etapas. Los tampones se dispusieron, tal como está indicado en las Tablas 5.2 y 5.3, respectivamente en dos placas de pocillos profundos según la estructura de ensayo descrita en el Ejemplo 1. De cada condición se llevó a cabo una triple determinación. Ya que en la solución de proteína usada para la identificación solamente había pocas impurezas, a continuación se pudo determinar la concentración del producto mediante la absorción a 280 nm en el fotómetro de placa de microtitulación.

Tabla 5.2: condiciones de tampón y disposición sobre la placa de pocillos profundos 1

Equilibrado 1 (DWP1.1 columna 1-4)	Equilibrado 2 (DWP1.2 columna 5-8)	Lavado (DWP1.3 columna 9-12)	Valor de pH
Tris 50 mM AS 0 M	Tris 50 mM AS 0 M	Tris 50 mM AS 0 M	pH 6,5
Tris 50 mM, AS 0,1 M	Tris 50 mM, AS 0,1 M	Tris 50 mM AS 0,1 M	
Tris 50 mM, AS 0,2 M	Tris 50 mM, AS 0,2 M	Tris 50 mM, AS 0,2 M	
Tris 50 mM, AS 0,3 M	Tris 50 mM, AS 0,3 M	Tris 50 mM, AS 0,3 M	
Tris 50 mM AS 0,4 M	Tris 50 mM AS 0,4 M	Tris 50 mM AS 0,4 M	
Tris 50 mM, AS 0,6 M	Tris 50 mM, AS 0,6 M	Tris 50 mM, AS 0,6 M	
Tris 50 mM, AS 0,8 M	Tris 50 mM, AS 0,8 M	Tris 50 mM, AS 0,8 M	
Tris 50 mM, AS 1 M	Tris 50 mM, AS 1 M	Tris 50 mM, AS 1 M	

Tabla 5.3: condiciones de tampón y disposición sobre la placa de pocillos profundos 2

5

Elución 1 (DWP2.1 columna 1-4)	Elución 2 (DWP2.2 columna 5-8)	Elución 3 (DWP2.3 columna 9-12)	Valor de pH
Tris 50 mM AS 0 M	Tris 50 mM AS 0 M	Tris 50 mM AS 0 M	pH 6,5
Tris 50 mM, AS 0 M	Tris 50 mM, AS 0 M	Tris 50 mM, AS 0 M	
Tris 50 mM, AS 0,1 M	Tris 50 mM, AS 0 M	Tris 50 mM, AS 0 M	
Tris 50 mM, AS 0,2	Tris 50 mM, AS 0,1	Tris 50 mM AS 0 M	
Tris 50 mM AS 0,2 M	Tris 50 mM AS 0,1 M	Tris 50 mM, AS 0 M	
Tris 50 mM, AS 0,4 M	Tris 50 mM, AS 0,2 M	Tris 50 mM, AS 0 M	
Tris 50 mM, AS 0,6 M	Tris 50 mM, AS 0,3 M	Tris 50 mM, AS 0 M	
Tris 50 mM, AS 0,6 M	Tris 50 mM, AS 0,3 M	Tris 50 mM, AS 0 M	

10

Las concentraciones de producto en las fracciones individuales están representadas en las figuras Fig. 5.1. a Fig. 5.4. Se comprobó que mAb2 se une únicamente con concentraciones de sal muy elevadas a la matriz hidrófoba. Con ello, en el caso de mAb2 es más adecuado configurar una etapa del proceso de cromatografía de interacción hidrófoba como etapa de cromatografía de paso. Las condiciones óptimas para esto se pueden establecer, de forma rápida y con una reducida complejidad de costes, gracias a otras identificaciones llevadas a cabo de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para hallar parámetros adecuados para procedimientos de cromatografía para la separación de biomoléculas, llevándose a cabo, con variación de parámetros individuales, ensayos con material de cromatografía que incluyen una secuencia de etapas de etapas de equilibrado, carga, lavado y elución y deduciéndose parámetros óptimos a partir de los resultados de estos ensayos, empleándose el material de cromatografía por enfoque en una cantidad para que el lecho de gel obtenido con ello presente un volumen entre 0,01 ml y 2 ml, en el que
- 10 (a) una puesta en suspensión de un material de cromatografía se pone en múltiples cavidades de una placa de filtro multipocillo,
- (b) en las cavidades provistas de la puesta en suspensión se genera un lecho de gel húmedo al retirarse el sobrenadante sobre el material de cromatografía mediante centrifugación o mediante aplicación de una diferencia de presión,
- 15 (c) para el equilibrado del material de cromatografía que se encuentra en las cavidades se añade al lecho de gel húmedo una solución de tampón de equilibrado y el lecho de gel se pone en suspensión (etapa de equilibrado),
- (d) correspondientemente a la etapa (b) se genera un lecho de gel húmedo,
- (e) opcionalmente, las etapas (c) y (d) se repiten varias veces, en particular una vez, dos veces o tres veces,
- (f) para la carga del material de cromatografía se añade al lecho de gel una solución de ensayo que contiene al menos una biomolécula y se pone en suspensión el lecho de gel (etapa de carga),
- 20 (g) correspondientemente a la etapa (b) se genera un lecho de gel húmedo,
- (h) para el lavado del material de cromatografía se añade al lecho de gel una solución de lavado, poniéndose opcionalmente en suspensión el lecho de gel (etapa de lavado),
- (i) correspondientemente a la etapa (b) se genera un lecho de gel húmedo,
- (k) opcionalmente, las etapas (h) e (i) se repiten varias veces, en particular una vez, dos veces o tres veces,
- 25 pudiendo presentar las soluciones de lavado usadas composiciones iguales o diferentes y poniéndose en suspensión o no poniéndose en suspensión opcionalmente el lecho de gel,
- (l) para la elución de la biomolécula se añade al lecho de gel una solución de elución sin causar una puesta en suspensión del lecho de gel (etapa de elución),
- (m) correspondientemente a la etapa (b) se genera un lecho de gel húmedo y en este caso se recoge el eluato,
- 30 (n) opcionalmente, las etapas (l) y (m) se repiten varias veces, en particular una vez, dos veces o tres veces, pudiendo presentar las soluciones de elución usadas composiciones iguales o diferentes y
- (o) los eluatos recogidos se analizan.
- 35 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se llevan a cabo las etapas de equilibrado, carga, lavado y elución en varios enfoques paralelos, diferenciándose las condiciones de cromatografía al menos en dos de los enfoques y deduciéndose, mediante comparación de los resultados de la cromatografía de los respectivos enfoques, condiciones ventajosas de cromatografía.
- 40 3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, en el que se llevan a cabo una o varias etapas mediante el uso de un robot de pipeteado.
- 45 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se emplea como material de cromatografía un material para la cromatografía de intercambio iónico, de interacción hidrófoba, de afinidad, de hidroxapatita, de fase inversa, de inducción de carga hidrófoba o de modo mixto.
- 50 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se realiza la puesta en suspensión mediante agitación del material de cromatografía o de la placa de filtro multipocillo o mediante el pipeteado hacia arriba y abajo del material de cromatografía.
- 55 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, siendo la biomolécula una proteína, una mezcla de proteínas o una mezcla de proteínas de célula hospedadora y una proteína diana sobreexpresada.
7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, incubándose después de la adición de la solución de equilibrado y/o la solución de ensayo y/o la solución de lavado y/o la solución de elución el material de cromatografía con la solución de equilibrado, ensayo, lavado o elución.
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los eluatos de la o de las etapas de elución y opcionalmente además las soluciones de paso de las etapas de carga y lavado se recogen y se analizan.

Fig.1

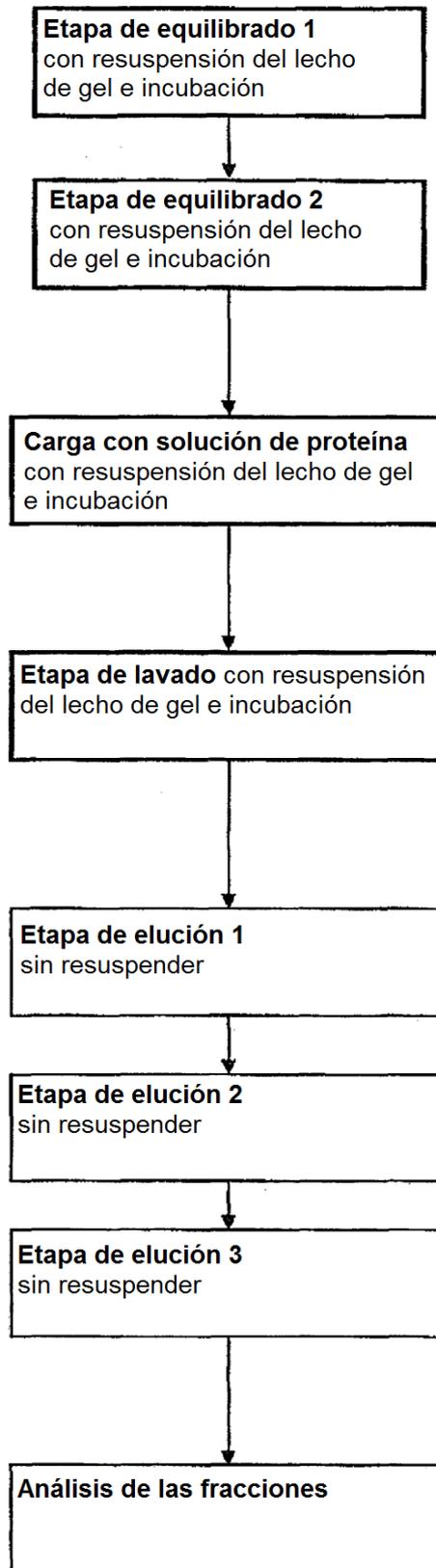


FIG. 2

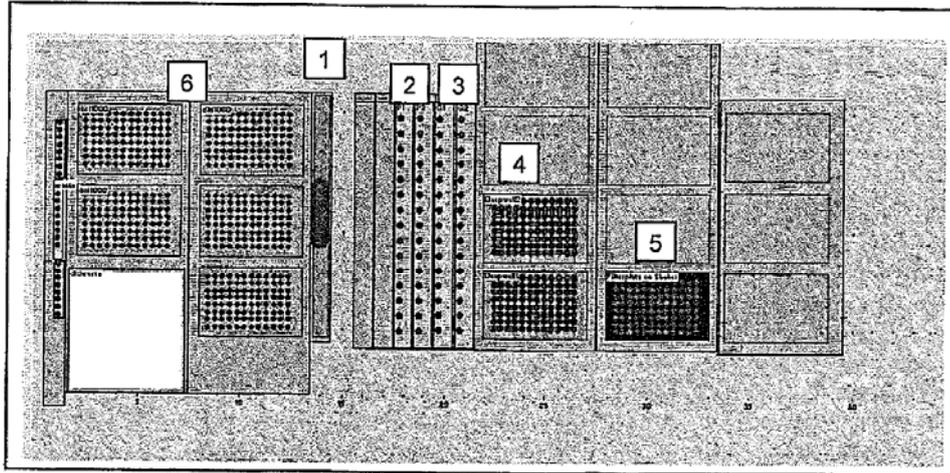


FIG. 3

Fig. 3.1: SP Sepharose FF:

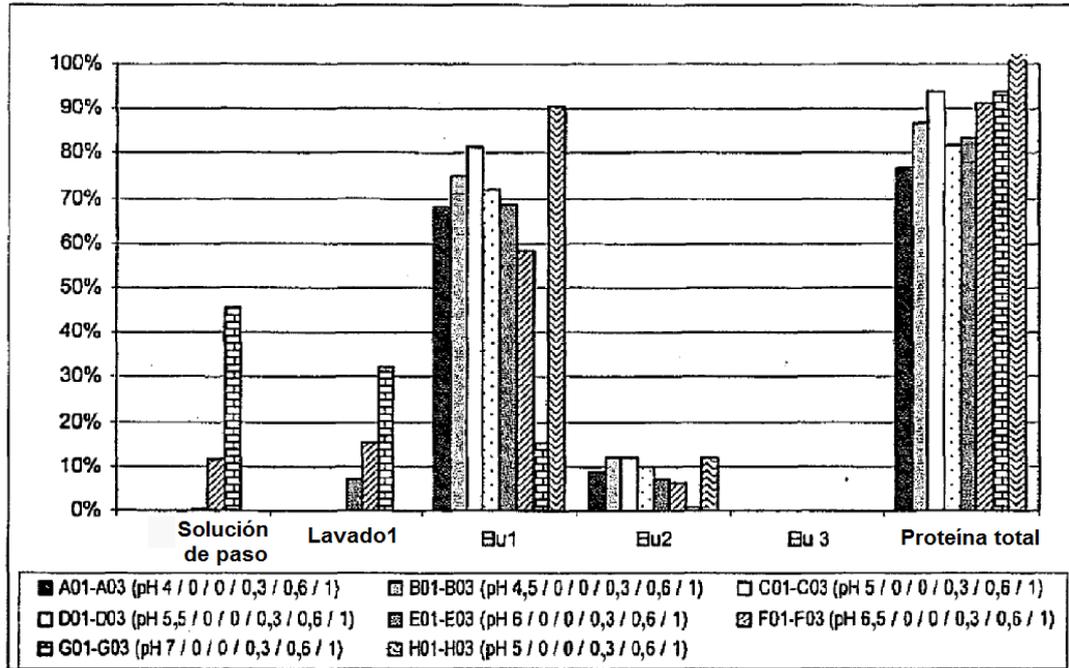


Fig. 3.2: Toyopearl SP 650M:

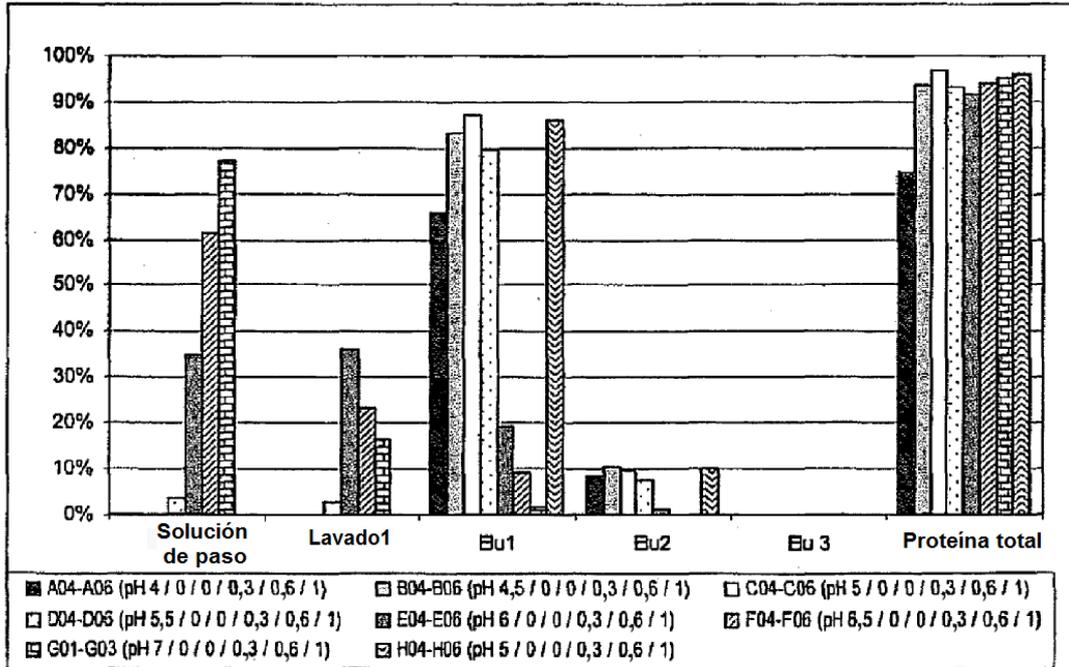


Fig. 3.3: Toyopearl SP 550 C:

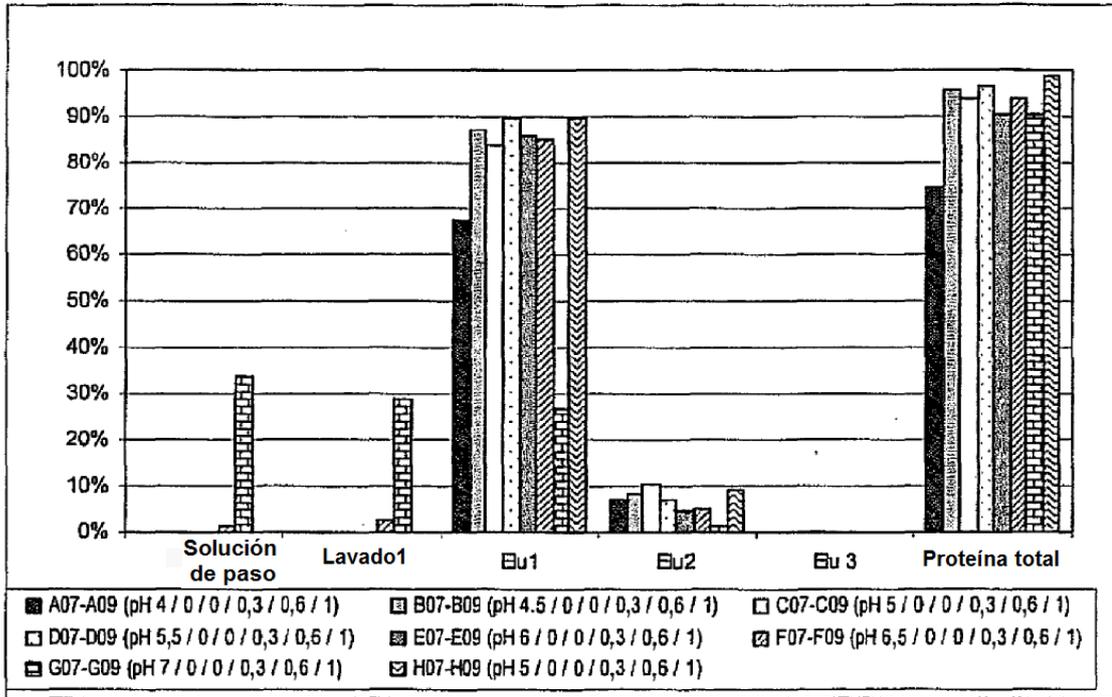


Fig. 3.4: EMD Fractogel SO3:

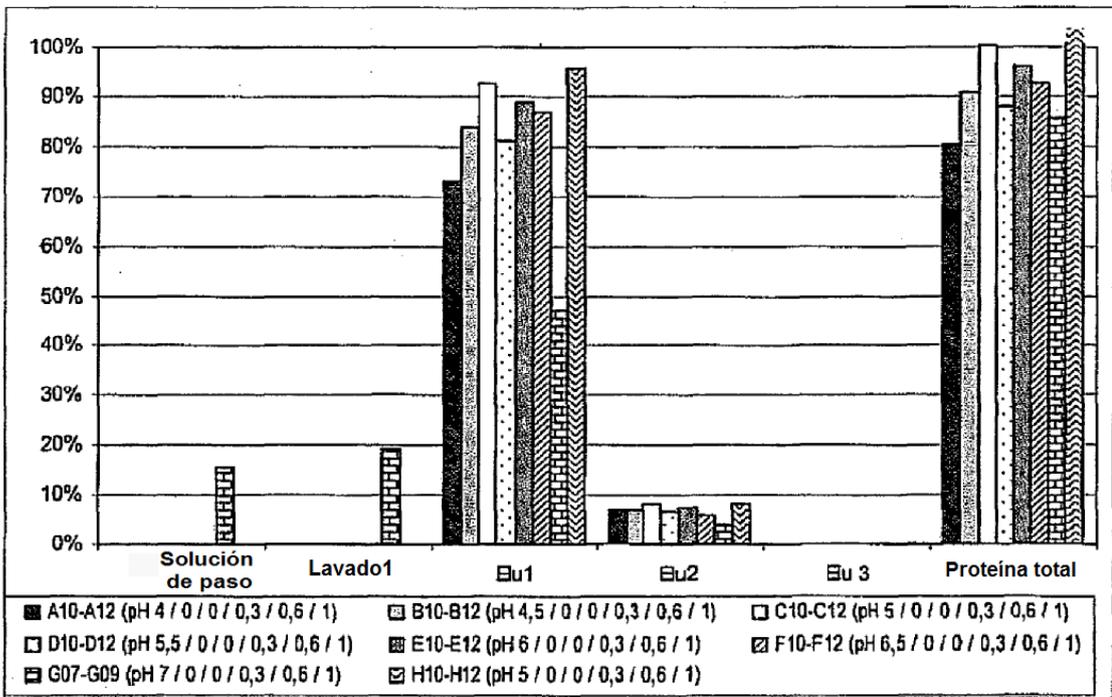


Fig. 3.5: CM Ceramic Hyper DLS:

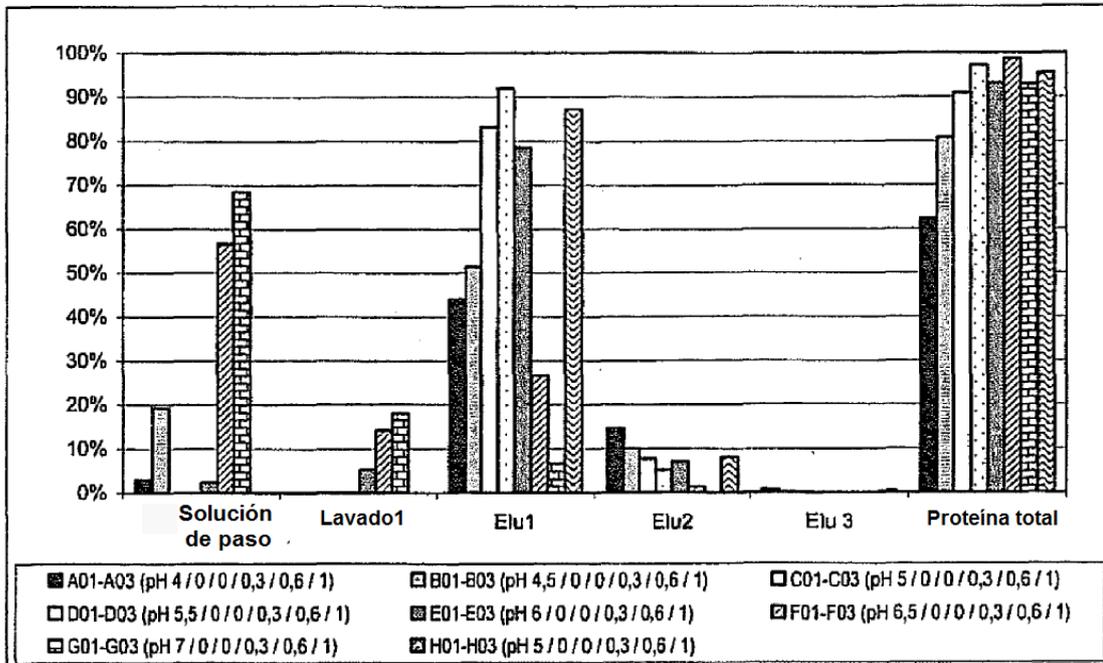


Fig. 3.6: S Ceramic Hyper DF:

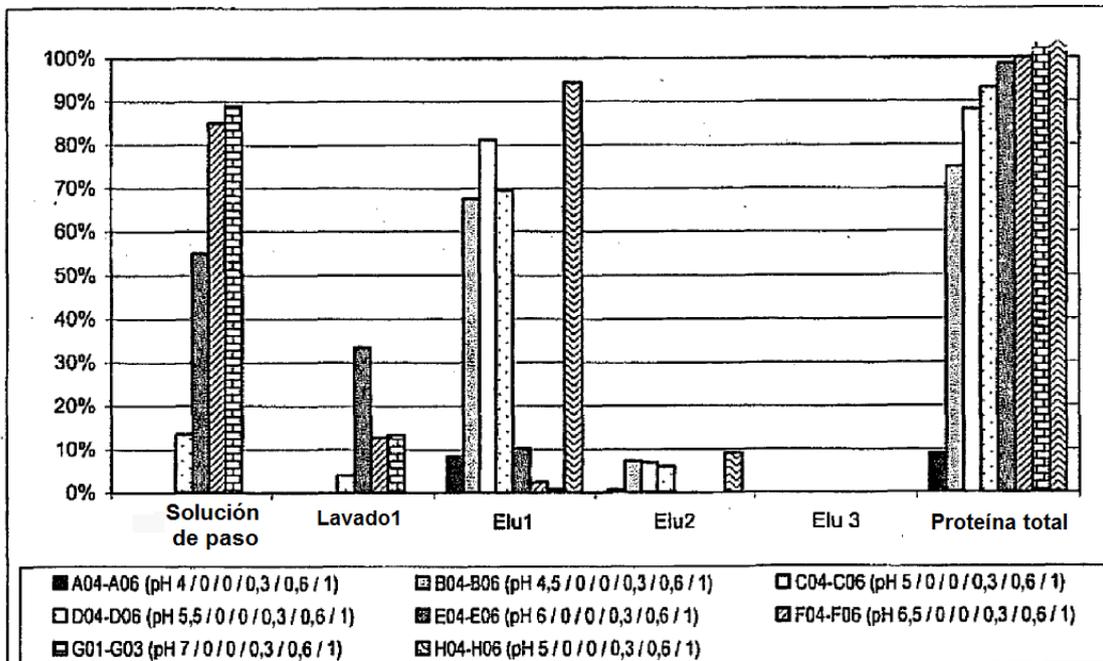


Fig. 3.7: Poros 50 HS:

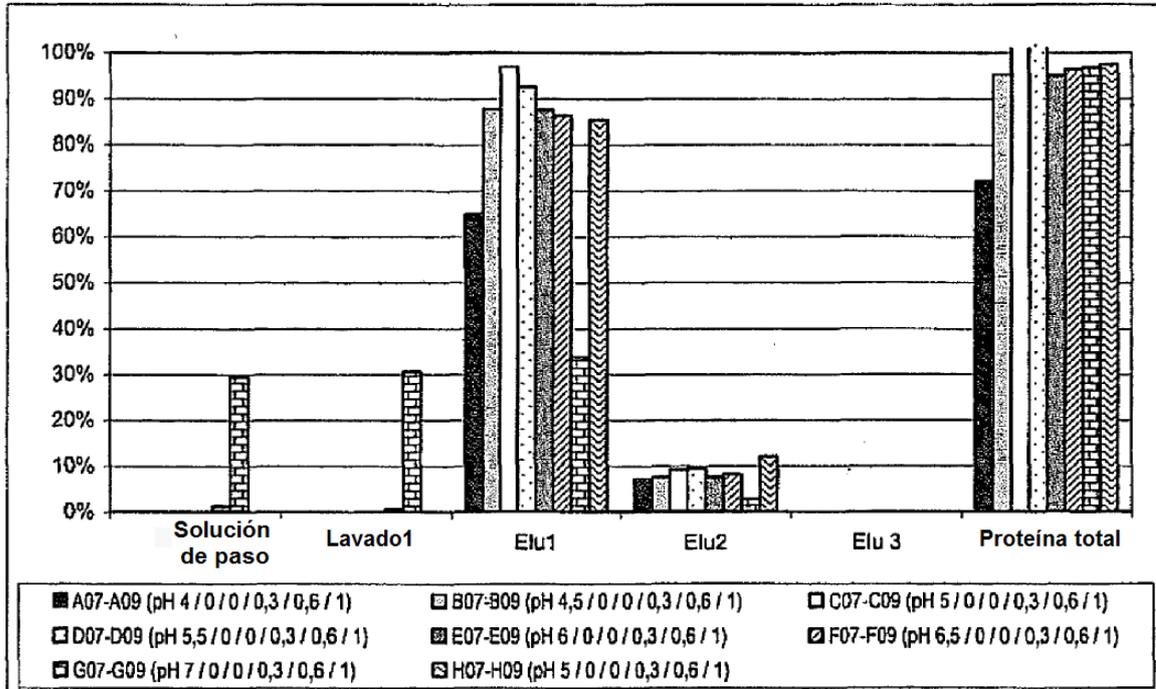


Fig. 3.8: CM Sepharose FF:

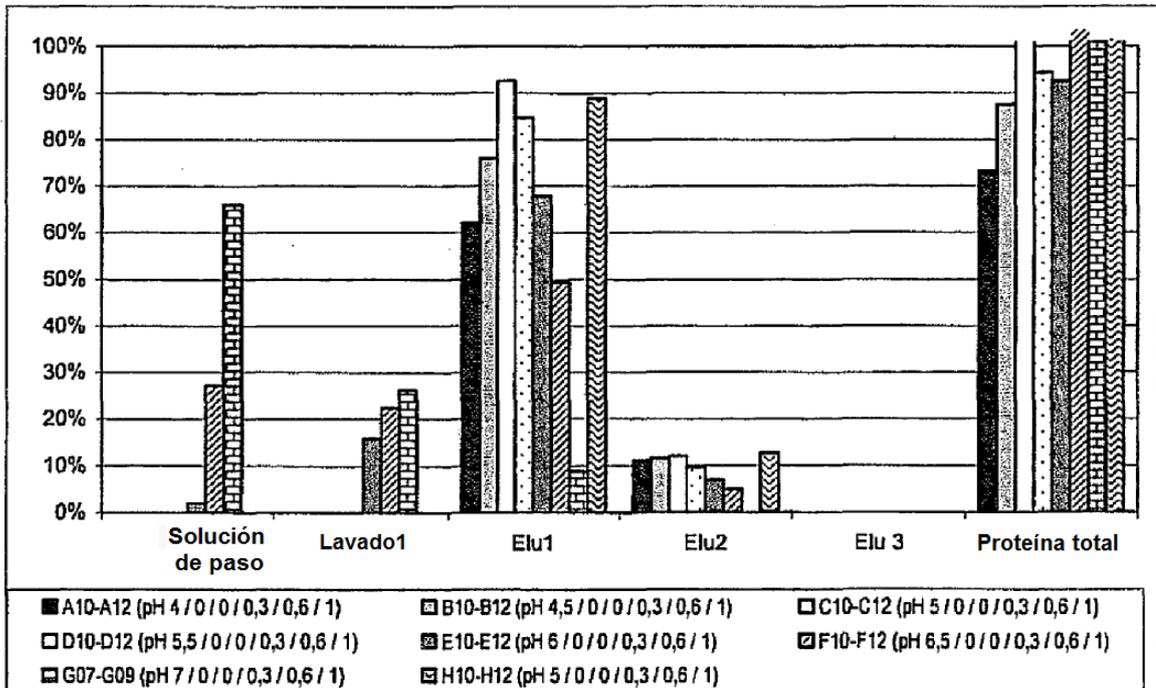


Fig. 3.9: SP Sepharose FF:

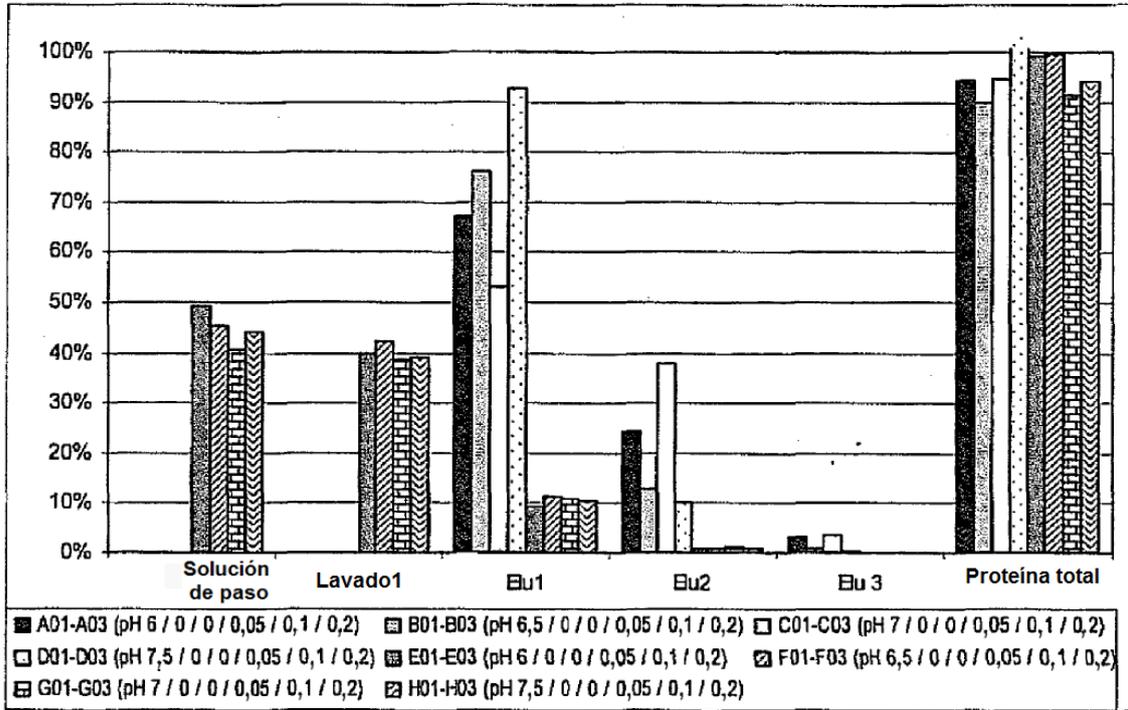


Fig. 3.10: Toyopearl SP 550 C:

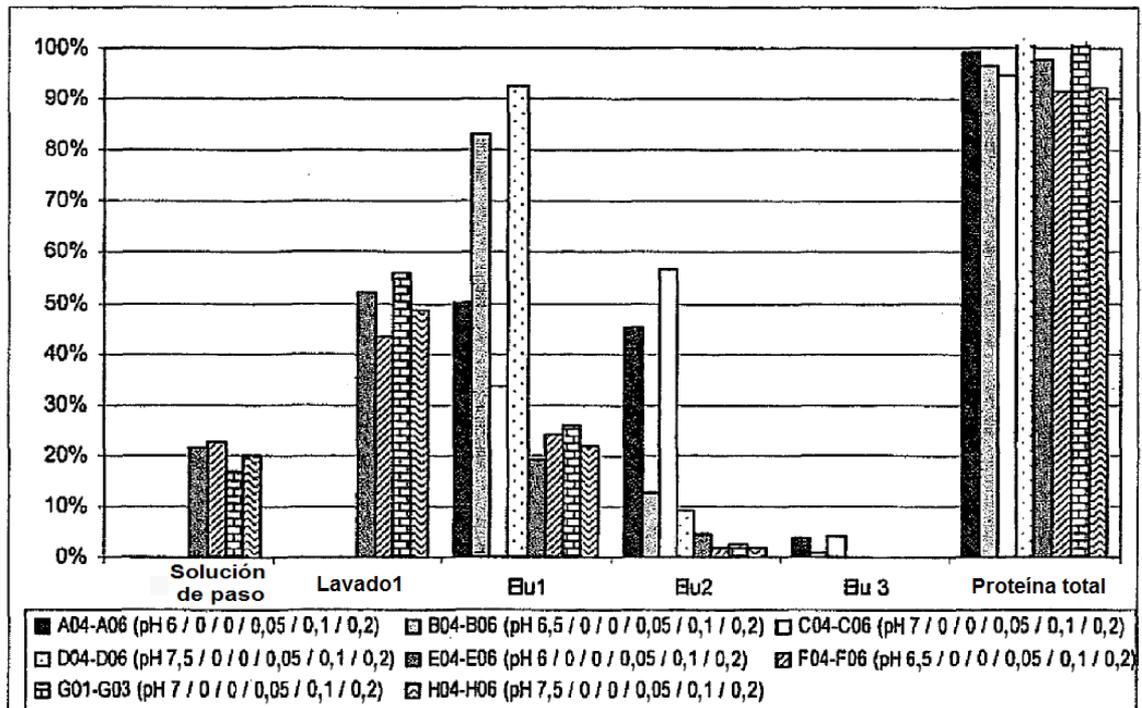


Fig. 3.11: Poros 50 HS:

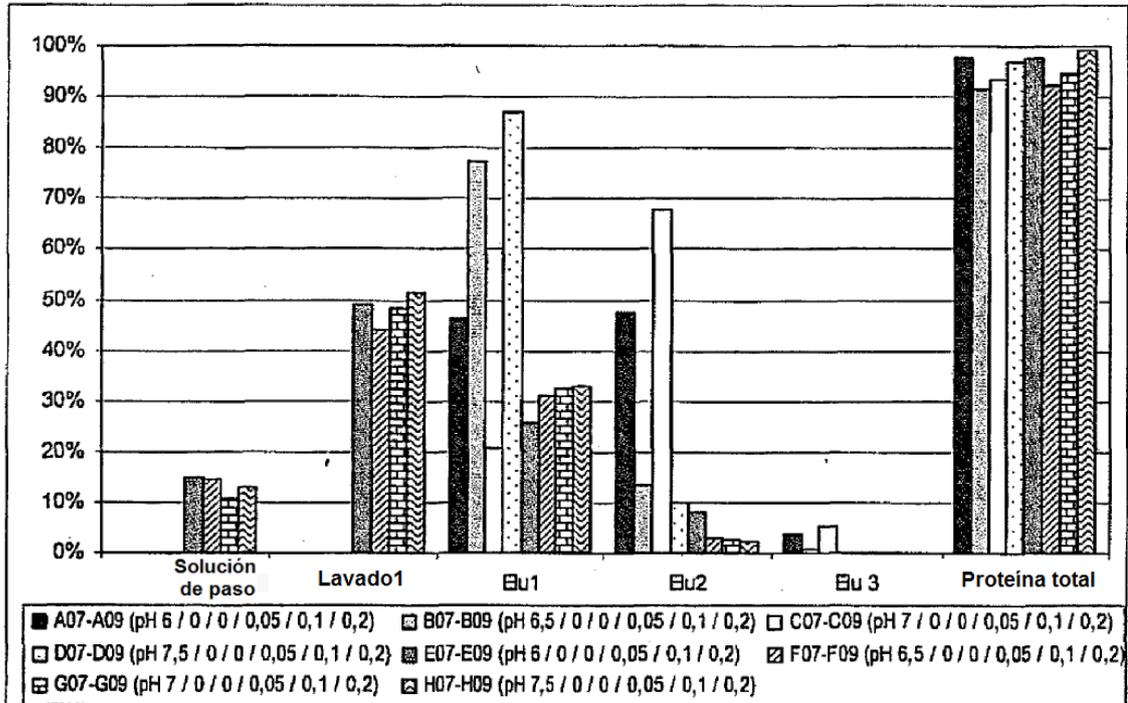


Fig. 3.12: EMD Fractogel SO3:

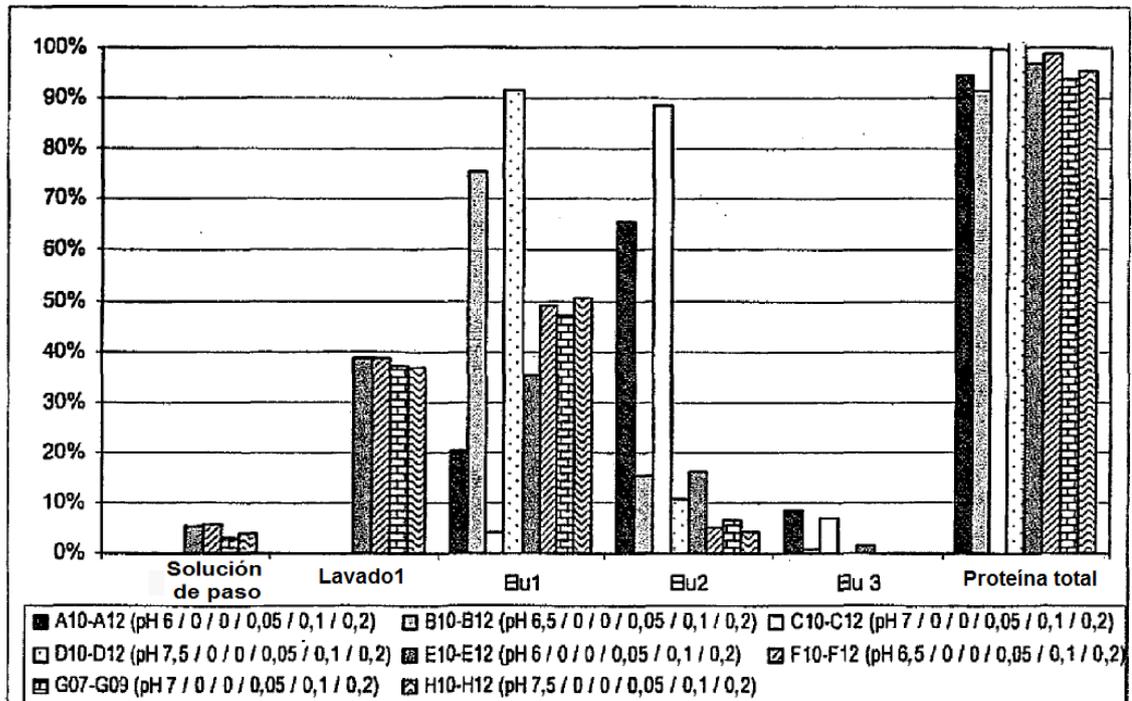


Fig. 4

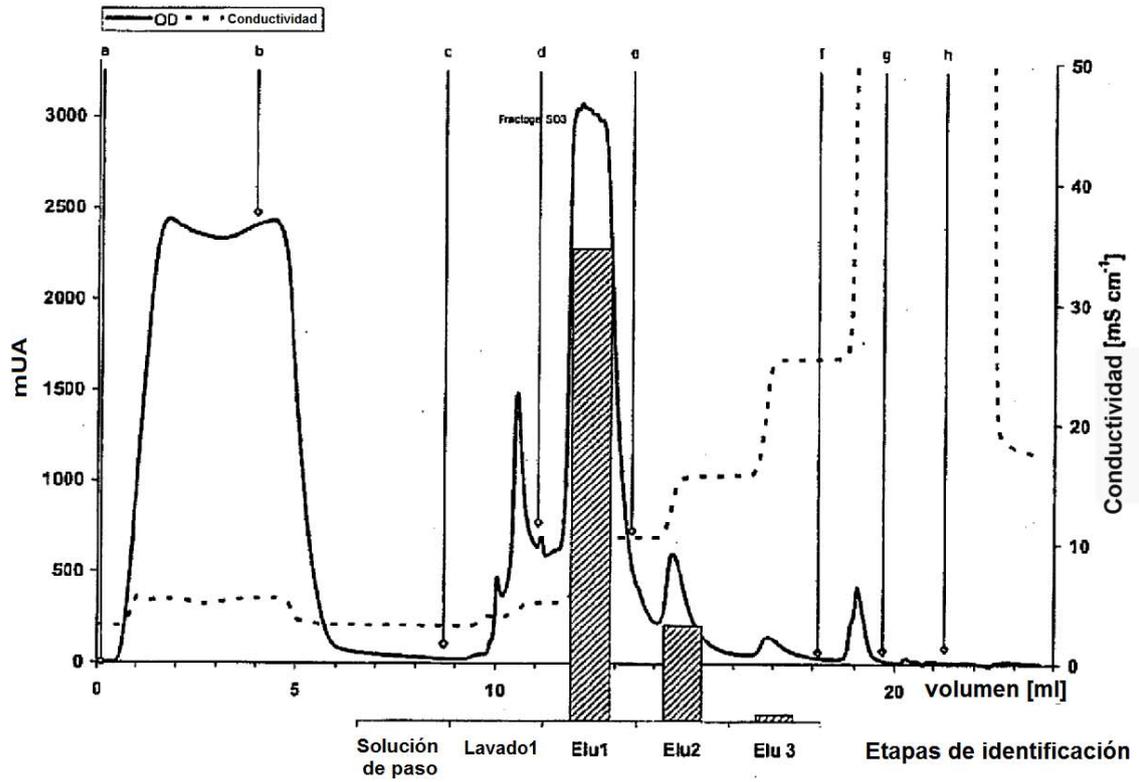


Fig. 5

Fig. 5.1: Fenil Sepharose HP:

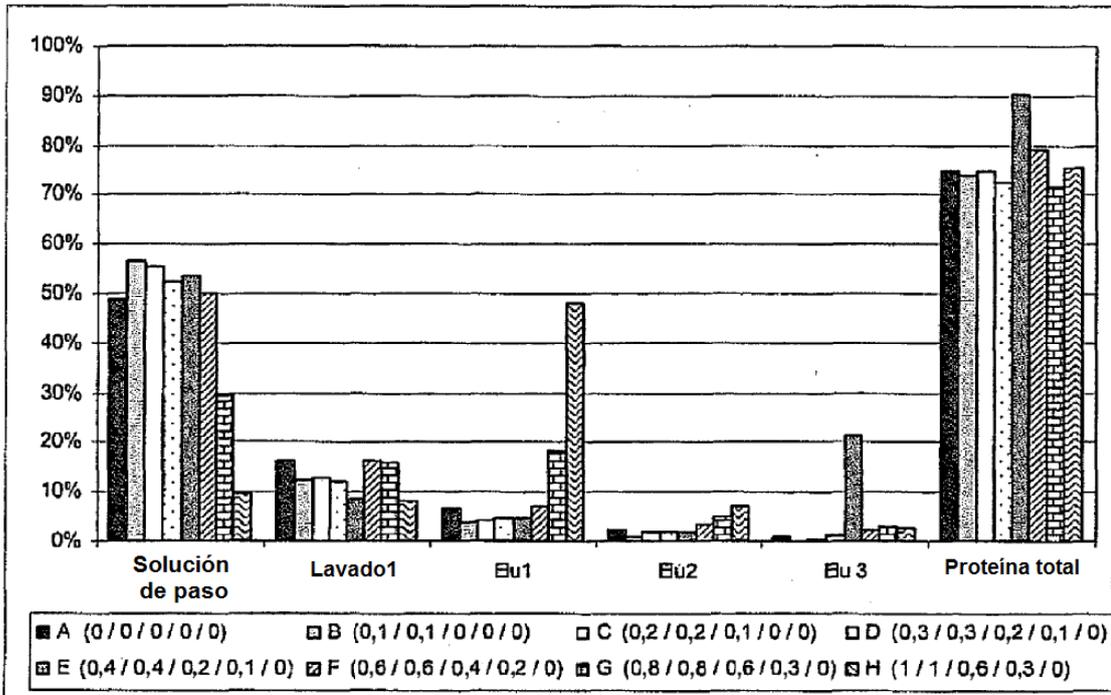


Fig. 5.2: Fenil Sepharose FF:

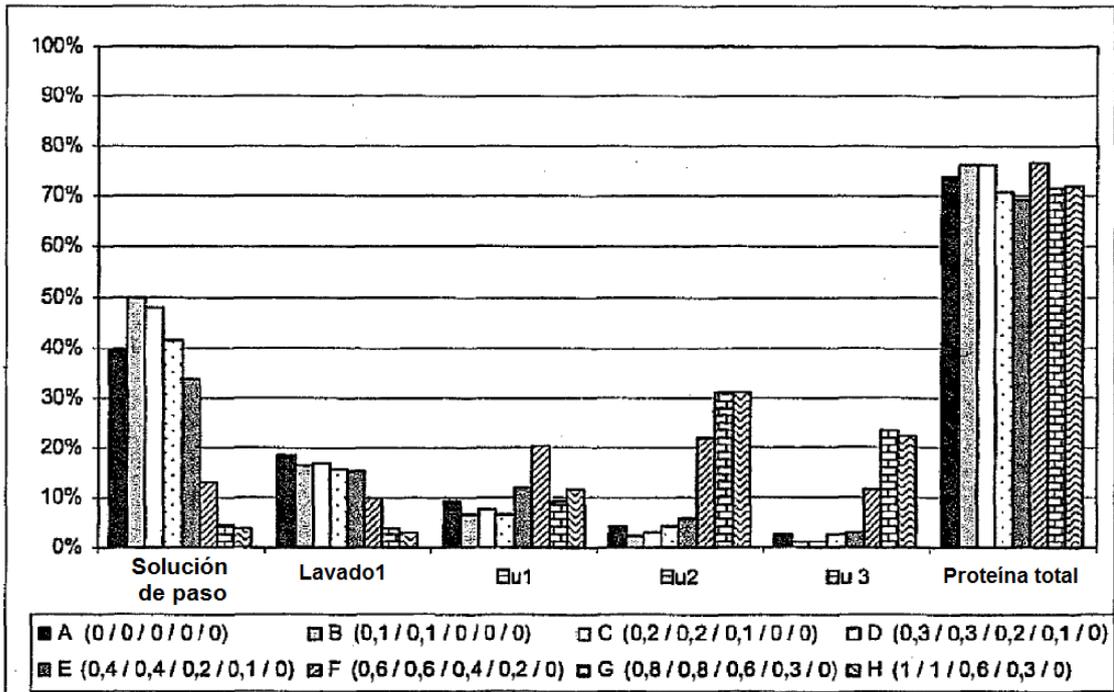


Fig. 5.3: Toyopearl Fenilo:

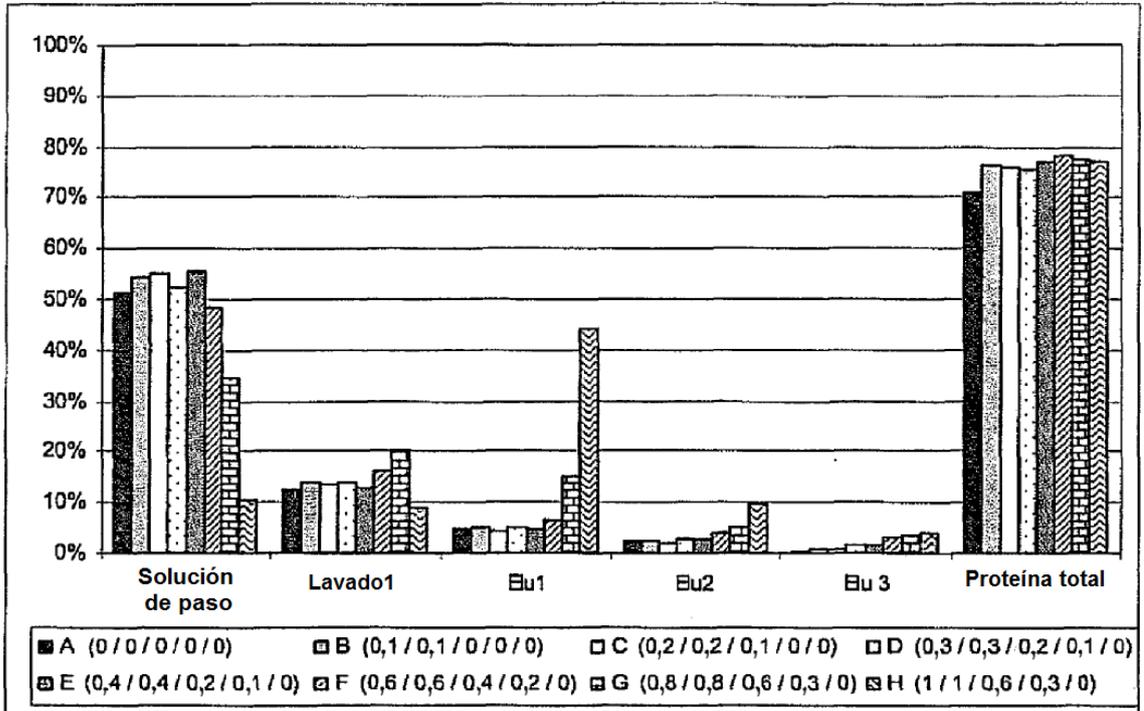


Fig. 5.4: Toyopearl Butilo:

