

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 572**

51 Int. Cl.:

B01D 15/32	(2006.01)
B01D 15/36	(2006.01)
B01D 15/38	(2006.01)
B01J 20/32	(2006.01)
B01J 20/286	(2006.01)
B01J 41/20	(2006.01)
C07K 1/16	(2006.01)
C07K 1/36	(2006.01)
C07K 16/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2005 PCT/SE2005/001592**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.04.2006 WO06043896**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2005 E 05796563 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 1827691**

54 Título: **Matriz de cromatografía**

30 Prioridad:

21.10.2004 SE 0402558
26.11.2004 SE 0402910

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.05.2017

73 Titular/es:

GE HEALTHCARE BIOPROCESS R&D AB
(100.0%)
Björkgatan 30
751 84 Uppsala, SE

72 Inventor/es:

ENGSTRAND, CARINA;
FORSS, ANNIKA;
GLAD, GUNNAR;
JOHANSSON, BO-LENNART y
MALOISEL, JEAN-LUC

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 612 572 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

Matriz de cromatografía

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a nuevas matrices de cromatografía, que son útiles para la purificación de biomoléculas tales como proteínas. La presente matriz es útil p.ej. para la purificación de anticuerpos, preferiblemente inmovilizados en un soporte poroso tal como partículas o una membrana. En consecuencia, la invención abarca una matriz de cromatografía que comprende nuevos ligandos, un método para la preparación de los mismos y un método para la purificación de anticuerpos.

Antecedentes

10 El sistema inmunitario está compuesto de muchos tipos de células interdependientes que protegen colectivamente el organismo de infecciones bacterianas, parasitarias, fúngicas, virales, y del crecimiento de células tumorales. Los guardianes del sistema inmunitario son los macrófagos que recorren continuamente el torrente sanguíneo de su anfitrión. Al ser amenazados por la infección o inmunización, los macrófagos responden envolviendo los invasores marcados con moléculas foráneas conocidas como antígenos. Este evento, mediado por las células T auxiliares,
15 establece una complicada cadena de respuestas que da como resultado la estimulación de las células B. Estas células B, a su vez, producen proteínas llamadas anticuerpos, que se unen al invasor foráneo. El evento de unión entre el anticuerpo y el antígeno marca el invasor foráneo para su destrucción a través de la fagocitosis o la activación del sistema del complemento. Existen varias clases diferentes de anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas, tales como IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. Se diferencian no sólo en sus papeles fisiológicos sino
20 también en sus estructuras. Desde un punto de vista estructural, los anticuerpos IgG se han estudiado extensamente, quizás debido al papel dominante que juegan en una respuesta inmune madura. Los anticuerpos policlonales se producen de acuerdo con los métodos de inmunización convencionales de un animal con el antígeno apropiado. En respuesta, el animal producirá anticuerpos que son policlonales. Sin embargo, para muchos fines, se desea disponer de un único clon de un determinado anticuerpo, conocido como anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales (MAb) son producidos por células híbridas o fusionadas que comprenden una fusión entre
25 una célula B normal, que produce sólo un único anticuerpo, y una célula de tumor de mieloma anormal. El híbrido resultante, conocido como hibridoma, se utiliza hoy en día en métodos convencionales para la producción de anticuerpos.

30 La actividad biológica que poseen las inmunoglobulinas es explotada a día de hoy en una serie de diferentes aplicaciones en el sector del diagnóstico, de protección de la salud y terapéutico humanos y veterinarios. De hecho, en los últimos años, los anticuerpos monoclonales y los constructos de anticuerpos recombinantes se han convertido en la clase más grande de proteínas investigadas actualmente en ensayos clínicos y que reciben la aprobación de la FDA como agentes terapéuticos y de diagnóstico. Como complemento a los sistemas de expresión y las estrategias de producción, se requieren protocolos de purificación eficaces para obtener anticuerpos altamente puros de una
35 manera sencilla y rentable.

Los métodos tradicionales para el aislamiento de inmunoglobulinas se basan en la precipitación reversible selectiva de la fracción proteica que comprende las inmunoglobulinas mientras se dejan otros grupos de proteínas en solución. Los agentes de precipitación típicos son etanol, polietilenglicol, sales liotrópicas, tales como sulfato de amonio y fosfato de potasio, y ácido caprílico. Típicamente, estos métodos de precipitación están proporcionando
40 productos muy impuros, mientras que al mismo tiempo son lentos y laboriosos. Además, la adición del agente precipitante a la materia prima hace difícil utilizar el sobrenadante para otros fines y crea un problema de eliminación, que es particularmente relevante cuando se habla de la purificación a gran escala de las inmunoglobulinas.

45 Un método alternativo para el aislamiento de las inmunoglobulinas es la cromatografía, que abarca una familia de métodos de separación estrechamente relacionados. La característica que distingue la cromatografía de la mayoría de otros métodos físicos y químicos de separación es que se ponen en contacto dos fases mutuamente inmiscibles, en donde una fase es estacionaria y la otra móvil. La mezcla de muestra, introducida en la fase móvil, experimenta una serie de interacciones con las fases estacionaria y móvil, a medida que ésta se lleva a través del sistema por la fase móvil. Las interacciones explotan las diferencias en las propiedades físicas o químicas de los componentes de
50 la muestra. Estas diferencias gobiernan la velocidad de migración de los componentes individuales bajo la influencia de una fase móvil que se mueve a través de una columna que contiene la fase estacionaria. Los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retardado eluye primero, el material retenido más fuertemente eluye el último. La separación se obtiene cuando un componente es retardado suficientemente para evitar el solapamiento con la zona de un soluto adyacente a medida que los componentes de la muestra eluyen de la columna. Se están realizando continuamente esfuerzos para diseñar la fase estacionaria óptima para cada propósito de separación específico. Tal fase estacionaria está compuesta comúnmente de una matriz de soporte o base a la que se ha unido un ligando que comprende grupos
55 funcionales, es decir, de unión. Se hace referencia comúnmente a cada tipo de cromatografía basándose en el

principio de interacción que utiliza, tal como cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía de afinidad se basa en interacciones específicas entre una biomolécula diana y un ligando biospecífico de acuerdo con un principio de reconocimiento cerradura-llave. Por lo tanto, la diana y el ligando constituirán un par de afinidad, tal como antígeno/anticuerpo, enzima/receptor etc. Los ligandos de afinidad basados en proteínas son bien conocidos, tales como cromatografía de afinidad con Proteína A y Proteína G que son ambos métodos generalizados para el aislamiento y la purificación de anticuerpos. Es bien conocido que la cromatografía con proteína A proporciona una especificidad excepcional, en particular hacia los anticuerpos monoclonales, y por consiguiente se pueden obtener purzas elevadas. Utilizados combinados con etapas de intercambio iónico, interacción hidrófoba, hidroxapatita y/o filtración en gel, los métodos basados en Proteína A se han convertido en el método de purificación de anticuerpos de elección para muchas compañías biofarmacéuticas, véase, p.ej. el documento WO 8400773 y el documento US 5.151.350. Sin embargo, debido a los enlaces peptídicos de las proteínas, las matrices de proteína A presentan un cierto grado de sensibilidad alcalina. Además, cuando se utilizan matrices de Proteína A para purificar anticuerpos a partir de medios de cultivo celular, las proteasas procedentes de las células pueden causar una pérdida de Proteína A, o fragmentos peptídicos de la misma.

La cromatografía de intercambio iónico se utiliza con frecuencia en los protocolos para el aislamiento de inmunoglobulinas. En la cromatografía de intercambio aniónico, las cadenas laterales de aminoácidos con carga negativa de la inmunoglobulina interactuarán con ligandos cargados positivamente de una matriz de cromatografía. En la cromatografía de intercambio catiónico por otra parte, las cadenas laterales de aminoácidos con carga positiva de la inmunoglobulina interactuarán con ligandos cargados negativamente de una matriz de cromatografía.

La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) es otro método descrito y utilizado en los protocolos para el aislamiento de inmunoglobulinas. Si un producto de inmunoglobulina de alta pureza es el objeto, se recomienda comúnmente combinar la HIC con una o más etapas adicionales. En la HIC, con el fin de hacer que la inmunoglobulina se una de manera eficiente a la matriz de la HIC, se requiere la adición de sales liotrópicas a la fase móvil. La inmunoglobulina unida se libera posteriormente de la matriz disminuyendo la concentración de sal liotrópica. Por lo tanto, una desventaja de este procedimiento es la necesidad de añadir sal liotrópica a la materia prima, ya que esto puede causar problemas y en consecuencia un aumento del coste para el usuario a gran escala. Por ejemplo, para las materias primas tales como suero, plasma, y yema de huevo, la adición de sales liotrópicas a las materias primas sería en muchos casos prohibitiva en aplicaciones a gran escala, ya que la sal podría evitar cualquier uso económicamente factible de la materia prima empobrecida en inmunoglobulina. Un problema adicional en las aplicaciones a gran escala sería la eliminación de varios miles de litros de desechos.

El documento US 5.945.520 (Burton et al) describe resinas cromatográficas de modo mixto que presentan un carácter hidrófobo al pH de la unión y un carácter hidrófilo y/o electrostático al pH de desorción. La resina está diseñada específicamente para unir el compuesto diana de una solución acuosa a una fuerza iónica baja y alta. Esto se consigue mediante ligandos ionizables seleccionados que comprenden un brazo espaciador y al menos una funcionalidad ionizable, en donde la densidad de los ligandos ionizables sobre la matriz sólida de soporte es mayor que el menor de o bien aproximadamente 150 μ moles/ml de resina o bien 1 mmol/gramo de peso seco de resina. Además, el carácter hidrófobo de la resina que comprende dichos ligandos ionizables es suficiente para unir al menos 50% del compuesto diana en un medio acuoso a una fuerza iónica alta y baja a un primer pH. Los ejemplos ilustrativos de la funcionalidad ionizable son 4-(aminometil)piridina, 3-(aminometil)piridina, 2-(aminometil)piridina, 1-(3-aminopropil)imidazol, 2-(aminometil)bencimidazol, 4-(3-aminopropil)morfolina.

Adicionalmente, el documento WO 01/38228 (Belew et al.) se refiere a un método para la adsorción de intercambio aniónico en donde se utilizan intercambiadores aniónicos de tioéter para eliminar una sustancia cargada negativamente de un líquido mediante su unión. Cada ligando comprende un nitrógeno cargado positivamente y un enlace tioéter a una distancia de 1-7 átomos de dicho nitrógeno cargado. Las sustancias deseadas, tales como células, partes de células y sustancias que comprenden estructuras de péptidos se adsorben a las concentraciones de sal en la región de NaCl 0,25 M.

El documento WO 01/38227 describe intercambiadores de aniones con ligandos aromáticos para la separación de alto contenido de sal de, p.ej., proteínas. J B Crowther et al.: J Chromatography 282, 619-628 (1983) describen matrices con ligandos de bencildimetilamina para separaciones de ácido nucleico.

Finalmente, el documento US 6.702.943 (Johansson et al.) describe un método para la eliminación de una sustancia diana de un líquido mediante su adsorción a una matriz que porta una pluralidad de ligandos que comprenden grupos de intercambio aniónico y una estructura hidrófoba. Más específicamente, los ligandos contienen un anillo aromático en la proximidad de los grupos de intercambio aniónico con carga positiva. Se indica que las sustancias deseadas son células, partes de células y sustancias que comprenden estructuras peptídicas. Los ligandos descritos se designan "ligandos de alta salinidad" debido a su capacidad de adsorber sustancias diana a altas concentraciones de sal tales como NaCl 0,25 M.

Sin embargo, para optimizar un procedimiento relacionado con la purificación de una molécula diana específica, se requerirán condiciones especiales de funcionamiento, y la matriz de mejor separación variará de un caso a otro. Por

ejemplo, en la industria de la biotecnología, se necesita diseñar procedimientos específicos para la purificación de péptidos y proteínas; ácidos nucleicos; virus, etc. Adicionalmente, en la purificación de anticuerpos, el tipo de anticuerpo será decisivo para la elección de la matriz de separación. Por lo tanto, todavía existe una necesidad en este campo de matrices de separación alternativas para proporcionar un amplio espectro de opciones para la purificación de los muchos nuevos productos que se desarrollan constantemente.

Breve descripción de la invención

Un aspecto de la presente invención es proporcionar una matriz de separación novedosa que es útil en la separación de los anticuerpos de otros componentes de un líquido.

Un aspecto específico de la invención es proporcionar tal matriz, que es capaz de adsorber las proteínas contaminantes, pero no el anticuerpo diana.

Otros aspectos y ventajas de la invención aparecerán a partir de la descripción detallada que sigue.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un ligando de cromatografía ilustrativo de acuerdo con la invención, es decir, N-bencil-N-metiletanolamina acoplado a un soporte a través de su amina.

La Figura 2 muestra un cromatograma de la separación del anticuerpo monoclonal en una matriz de separación que comprende ligandos de N-bencil-N-metiletanolamina inmovilizados sobre Sepharose™ 6 FF; y como referencia, el fuerte intercambiador aniónico Q Sepharose™ FF, y N,N-dimetil-bencilamina como se describe a continuación.

Las Figuras 3 a) y b) muestran los resultados de la cromatografía llevada a cabo en prototipos de ligandos con una mezcla de mAb1-rProteína A.

Las Figuras 4 a)-c) muestran los resultados de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) analítica en la muestra con MAb 1, rPrA al 1% y fracciones de flujo continuo y de eluato reunidas de las rondas cromatográficas en la figura 3.

Definiciones

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan indistintamente en la presente memoria.

El término "matriz de separación" se utiliza en la presente memoria para denotar un material compuesto de un soporte al que se han acoplado uno o más ligandos que comprenden grupos funcionales. El término "resina" se utiliza a veces para una matriz de separación en este campo.

El término matriz de separación "multi-modal" se refiere a una matriz capaz de proporcionar al menos dos sitios diferentes, pero cooperativos, que interactúan con el compuesto al que se van a unir. Por ejemplo, uno de estos sitios puede proporcionar un tipo atractivo de interacción carga-carga entre el ligando y la sustancia de interés. El otro sitio puede proporcionar la interacción de aceptor-donador de electrones y/o interacciones hidrofóbicas y/o hidrofílicas. Las interacciones donador-aceptor de electrones incluyen interacciones tales como enlaces de hidrógeno, π - π , catión- π , transferencia de carga, dipolo-dipolo, dipolo inducido, etc. Las matrices de separación "multimodales" también se conocen como matrices de separación de "modo mixto".

El término "superficie" significa en la presente memoria todas las superficies externas, e incluye en el caso de un soporte poroso las superficies exteriores, así como las superficies de los poros.

El término "eluyente" se utiliza en su significado convencional en este campo, es decir, un tampón de pH y/o fuerza iónica adecuados para liberar uno o más compuestos de una matriz de separación.

El término "etapa de captura" se refiere en el contexto de la cromatografía líquida a la etapa inicial de un procedimiento de separación. Con más frecuencia, una etapa de captura incluye la clarificación, concentración, estabilización y una purificación significativa de las impurezas solubles. Después de la etapa de captura, puede seguir una purificación intermedia, que reduce adicionalmente las cantidades restantes de impurezas tales como proteínas de células anfitrionas, ADN, virus, endotoxinas, nutrientes, componentes de un medio de cultivo celular, tales como agentes antiespumantes y antibióticos, e impurezas relacionadas con el producto, tales como agregados, especies mal plegadas y agregados. El término "desechable" se refiere en la presente memoria en el contexto de las columnas de cromatografía y otras matrices de separación a una matriz que está destinada a un solo uso, o a un número limitado de usos. Los productos desechables se utilizan ventajosamente para eliminar los contaminantes que son perjudiciales incluso en cantidades muy pequeñas, en cuyo caso es conveniente adsorber dicho contaminante a la matriz y a continuación descartar la matriz. Otra situación en la que se desean productos desechables es para el procesamiento estéril, en cuyo caso la matriz es estéril o al menos aséptica.

El término "etapa de pulido" se refiere en el contexto de la cromatografía líquida a una etapa de purificación final, en la que se retiran las trazas de impurezas para dejar un producto activo, seguro. Las impurezas eliminadas durante la

etapa de pulido son a menudo confórmers de la molécula diana o productos sospechosos de pérdida.

El término una "proteína de unión a Fc" significa una proteína capaz de unirse a la parte cristalizante (Fc) de un anticuerpo, e incluye, p.ej., Proteína A y Proteína G, o cualquiera de sus fragmentos o proteínas de fusión que ha mantenido dicha propiedad de unión.

5 Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención es una matriz de separación que comprende ligandos de cromatografía acoplados a través del grupo amina a un soporte. La matriz de acuerdo con la invención es especialmente útil en la purificación de anticuerpos, como se discutirá en más detalle a continuación.

El presente ligando se define mediante la siguiente fórmula



en donde

R_1 es un grupo fenilo no sustituido;

R_2 es $-CH_2-$;

R_3 es $-CH_3$;

15 R_4 es $-CH_2-CH_2-CH_2-$ o $-CH_2-CH_2-$; y

R_5 es OH.

Por lo tanto, en una realización ventajosa, la matriz de acuerdo con la invención comprende ligandos de N-bencil-N-metil etanol amina (BMEA).

20 El ligando es sintetizado fácilmente por el experto en este campo utilizando métodos convencionales de química orgánica.

Un segundo aspecto de la invención es un método de preparación de una matriz de separación, cuyo método comprende inmovilizar una pluralidad de ligandos como se describió anteriormente en un soporte. Con el fin de proporcionar una matriz adecuada para un solo uso especialmente en el campo médico o de diagnóstico, la matriz de separación preparada de acuerdo con la invención también se esteriliza en una etapa posterior. Por lo tanto, en una realización, el método comprende preparar una matriz como se describió anteriormente; proporcionar la matriz preparada de este modo en una columna; y esterilizar la matriz así preparada. La esterilización se realiza fácilmente en condiciones adecuadas por el experto en este campo, tal como el tratamiento por calor; radiación; o cualquier otro método utilizado convencionalmente.

30 Como se desprende de la fórmula anterior, en su estado no inmovilizado, el ligando comprende una amina terciaria que constituirá un asa adecuada para el acoplamiento del mismo a un soporte, creando de este modo un ligando unido que comprende una amina cuaternaria y un grupo fenilo. En consecuencia, inmovilizado, el ligando según la invención se considera que es un ligando de intercambio aniónico multi-modal, ya que además del grupo amina cuaternaria con carga positiva también comprende la estructura de anillo aromático que es hidrófoba. Los métodos para la inmovilización de ligandos en las superficies porosas o no porosas son bien conocidos en este campo; véase, p.ej. Immobilized Affinity Ligand Techniques, Hermanson et al, Greg T. Hermanson, A. Krishna Mallia y Paul K. Smith, Academic Press, INC, 1992. En una realización, la densidad de ligandos en la superficie del soporte se encuentra en un intervalo cercano al que se utiliza comúnmente para las matrices de intercambio iónico convencionales.

40 En una realización ventajosa, el acoplamiento del ligando al soporte se proporciona mediante la introducción de un conector entre el soporte y el conector. El acoplamiento puede llevarse a cabo después de cualquier metodología de acoplamiento covalente convencional, tal como mediante el uso de epíclorhidrina; epibromhidrina; alil-glicidiléter; bis-epóxidos tales como butanodiol diglicidil éter; sustancias alifáticas sustituidas con halógeno, tales como di-cloro-propanol; y divinilsulfona. Estos métodos son bien conocidos en el campo y son llevados a cabo fácilmente por el experto en la técnica.

45 En una realización específica, de acuerdo con la invención, el ligando se acopla al soporte a través de una molécula conectora más larga, también conocida como prolongador. Los prolongadores son bien conocidos en este campo, y se utilizan comúnmente para aumentar estéricamente la distancia entre el ligando y el soporte. Los prolongadores a veces se denominan tentáculos o brazos flexibles, para una descripción más detallada de las posibles estructuras químicas, véase, por ejemplo el documento US 6.428.707. En resumen, el prolongador puede estar en forma de un polímero tal como un homo- o un copolímero. Los prolongadores poliméricos hidrófilos pueden ser de origen sintético, es decir, con un esqueleto sintético, o de origen biológico, es decir, un biopolímero con un esqueleto de origen natural. Los polímeros sintéticos típicos son poli(alcoholes vinílicos), poli(acril- y polimetacrilamidas, poli(éteres

vinílicos) etc. Los biopolímeros típicos son polisacáridos, tales como almidón, celulosa, dextrano, agarosa.

El soporte se puede preparar a partir de un material orgánico o inorgánico, y puede ser poroso o no poroso. En una realización, el soporte se prepara a partir de un polímero nativo, tal como material carbohidratado entrecruzado, por ejemplo, agarosa, agar, celulosa, dextrano, quitosano, konjac, carragenano, gelán, alginato, pectina, almidón, etc.

5 Los soportes poliméricos nativos son preparados fácilmente y entrecruzados opcionalmente de acuerdo con métodos convencionales, tales como gelificación en suspensión inversa (S Hjerten: *Biochim Biophys Acta* 79(2), 393-398 (1964)). En una realización especialmente ventajosa, el soporte es un tipo de agarosa relativamente rígida pero porosa, que se prepara por medio de un método que mejora sus propiedades de flujo, véase, p.ej. el documento US 6.602.990 (Berg) o el documento SE 0402322-2 (Berg et al.). En una realización alternativa, el soporte se prepara a

10 partir de un polímero o copolímero sintéticos, tales como polímeros sintéticos entrecruzados, por ejemplo estireno o derivados de estireno, divinilbenceno, acrilamidas, ésteres acrilato, ésteres metacrilato, vinilésteres, vinilamidas, etc. Tales polímeros sintéticos se preparan fácilmente y se entrecruzan opcionalmente de acuerdo con métodos convencionales, véase, p. ej. "Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization" (R Arshady: *Chimica e L'Industria* 70(9), 70-75 (1988)). Los soportes poliméricos nativos o sintéticos también están

15 disponibles de fuentes comerciales, tales como GE Healthcare, Uppsala, Suecia, por ejemplo, en forma de partículas porosas. En otra realización alternativa, el soporte se prepara a partir de un polímero inorgánico, tal como sílice. Los soportes porosos y no porosos inorgánicos son bien conocidos en este campo y se preparan fácilmente de acuerdo con métodos convencionales.

Los tamaños de partícula adecuados de la presente matriz de separación pueden estar en el intervalo de diámetro de 5-500 μm , tal como de 10-100 μm , p.ej., de 20-80 μm . En el caso de partículas esencialmente esféricas, el tamaño medio de partícula puede estar en el intervalo de 5-1000 μm , tal como de 10-500. En una realización específica, el tamaño medio de partícula está en el intervalo de 10-200 μm . El experto en este campo puede seleccionar fácilmente el tamaño de partícula y la porosidad adecuados en función del procedimiento que se vaya a utilizar. Por ejemplo, para un procedimiento a gran escala, por razones económicas, puede ser preferible un soporte

20 más poroso pero rígido para permitir el procesamiento de grandes volúmenes, especialmente para la etapa de captura. En la cromatografía, los parámetros de procesamiento, tales como el tamaño y la forma de la columna afectarán a la elección. En un procedimiento de lecho expandido, la matriz contiene comúnmente cargas de alta densidad, preferiblemente materiales de carga de acero inoxidable. Para otros procedimientos otros criterios pueden afectar a la naturaleza de la matriz.

Por lo tanto, la presente invención es una matriz de separación que comprende los ligandos descritos anteriormente, acoplados a un soporte. Como entiende el experto en este campo, cada soporte comprenderá comúnmente una pluralidad de ligandos. En una realización específica, el soporte comprende un ligando como se describe anteriormente combinado con un segundo tipo de ligando, en donde el ligando de acuerdo con la invención está presente hasta al menos aproximadamente 30%, preferiblemente al menos aproximadamente 50%, más

35 preferiblemente al menos aproximadamente 70% y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de la cantidad total de ligando. Tal matriz de separación de ligando combinada puede ser diseñada para un caso concreto, cuando un elemento de nuevas interacciones mejora sus propiedades de separación. El segundo tipo de ligando puede comprender uno o más grupos cargados, tal como un intercambiador de cationes utilizado para eluir compuestos por repulsión de cargas; grupos hidrófobos; grupos capaces de formar enlaces de hidrógeno; grupos de afinidad o similares.

En una primera realización, la matriz de acuerdo con la invención está en forma de partículas, tales como partículas de forma esencialmente esférica, alargada o irregular. En una realización específica, la matriz de separación se seca, de manera que las partículas secas que en el uso se sumergen en líquido conservan su forma original. En una

40 realización ilustrativa, tal matriz de separación seca se compone de partículas de agarosa secas. Sin embargo, la matriz de acuerdo con la invención puede adoptar alternativamente cualquier otra forma utilizada convencionalmente en la separación, tal como monolitos; filtros o membranas; capilares; chips; superficies; etc. En consecuencia, en una segunda realización, la matriz comprende una estructura membranosa, tal como una sola membrana, una pila de membranas o un filtro.

Un aspecto adicional de la presente invención es el uso de la matriz de separación descrita anteriormente. En una primera realización, la presente invención utiliza una matriz de separación como se ha descrito anteriormente en la purificación de proteínas. En una realización ventajosa del presente uso, la proteína es un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo; o una proteína de fusión que comprende un anticuerpo. En otra realización, la presente invención utiliza una matriz de separación como se describió anteriormente en la separación de cualquier otro compuesto, por ejemplo, uno seleccionado del grupo que consiste en polipéptidos; ácidos nucleicos, p.ej., ADN, ARN o sus

55 oligonucleótidos, plásmidos; virus; priones; células, tales como células procariotas o eucariotas; lípidos; carbohidratos; moléculas orgánicas, tales como moléculas orgánicas pequeñas; dianas de medicamentos; moléculas marcadoras de diagnóstico. El uso será discutido en más detalle a continuación. En otra realización más, la presente invención utiliza una matriz de separación como se describió anteriormente como soporte en cultivo celular, es decir, para inmovilizar células que crecen en las superficies. Como reconocerá el experto en este campo, en la presente

60 solicitud, el término separación se utiliza para la purificación; el aislamiento; y la eliminación de compuestos, pero también abarca la identificación de un compuesto diana, por ejemplo para fines de diagnóstico.

Un tercer aspecto de la presente invención es un método de separación, en donde un compuesto deseado tal como un anticuerpo se separa de uno o más de otros compuestos de una muestra líquida poniendo en contacto una fase móvil que comprende dicha muestra líquida con una matriz de separación como se describió anteriormente. En una realización ventajosa, el presente método se lleva a cabo utilizando los principios de la cromatografía líquida, es decir, mediante el paso de una fase móvil a través de una columna de cromatografía que comprende la matriz de separación de acuerdo con la invención. En otra realización alternativa, el presente método se lleva a cabo utilizando un procedimiento de cromatografía discontinua, en donde se añade la matriz de separación a un recipiente que comprende la muestra líquida. En una realización específica, la matriz de separación añadida en el modo discontinuo comprende partículas secas, tales como partículas de agarosa secas. En otra realización, el método se lleva a cabo utilizando los principios de la cromatografía de lecho expandido, es decir, mediante la adición de la fase móvil a un lecho expandido, tal como un lecho fluidizado, de una matriz de separación que está en forma de partículas esencialmente esféricas que comprenden carga de alta densidad.

En una primera realización del presente método, los compuestos no deseados se adsorben a la matriz de separación mientras que los compuestos deseados, tales como los anticuerpos, permanecen en la fase móvil sin ser adsorbidos. Como entiende el experto en este campo, la naturaleza e identidad de los compuestos adsorbidos dependerán del origen de la muestra líquida. Los ejemplos de los compuestos adsorbidos en la realización en la que los anticuerpos deseados no son adsorbidos son células y restos celulares; proteínas y péptidos; ácidos nucleicos, tales como ADN y ARN; endotoxinas, virus, residuos de los medios de cultivo, etc. En una realización específica, la presente matriz de separación se proporciona en una columna de cromatografía y la fase móvil se hace pasar a través de dicha columna por gravedad y/o bombeo, recuperándose los anticuerpos en el flujo continuo de la columna. Por lo tanto, una ventaja de esta realización es que no requiere ninguna elución del producto de anticuerpo de la columna. La evitación de una etapa de elución específica es atractiva desde un punto de vista del procedimiento, ya que un menor número de etapas se traducirá en un protocolo de purificación más rápido y por lo tanto reducirá los costes del procedimiento. Además los anticuerpos son sensibles a ciertas condiciones que, p.ej, perjudicarían su patrón de plegamiento; o los degradarían atacando sus enlaces peptídicos. Por lo tanto, a pesar de que las condiciones de elución para los intercambiadores aniónicos en general no implican ningún producto químico extremo, el cambio de sal y/o pH puede afectar al anticuerpo sensible, variando el efecto de una especie a otra, dependiendo del pl, la distribución de carga etc. En consecuencia, otra ventaja de esta realización es que se evita la adición de un eluyente y la aplicación de condiciones de elución a los compuestos deseados. Para obtener las condiciones más adecuadas para la adsorción de compuestos, la muestra líquida se combina con un tampón adecuado u otro líquido para proporcionar una fase móvil. La presente realización se ejecuta ventajosamente en condiciones convencionales para la cromatografía de intercambio aniónico, que comúnmente implica la adsorción a una concentración relativamente baja de sal. Por lo tanto, en una realización del presente método, la conductividad de la fase móvil está en el intervalo de 0-25, tal como de 10-15 mS/cm. En una realización, el pH de la fase móvil es de aproximadamente 5-6. Si se desea liberar posteriormente los compuestos adsorbidos, por ejemplo, para la reutilización de la matriz, la elución se puede llevar a cabo a una concentración de sal superior, p.ej. mediante el uso de un gradiente de sal creciente. También o alternativamente se puede desplazar el valor de pH, p.ej., para que sea un gradiente de pH decreciente, para eluir los compuestos adsorbidos.

En una segunda y alternativa realización del presente método, los compuestos deseados se adsorben a la matriz como en la cromatografía líquida convencional. La matriz puede ser reutilizada a continuación después de la elución selectiva del producto. La elución se lleva a cabo fácilmente haciendo pasar un tampón adecuado a través de la columna. Si fuera necesario, se pueden aplicar una o más etapas de lavado antes o entre cualquiera de tales pases. En una realización, las condiciones de funcionamiento de esta realización son como en el intercambio iónico convencional, es decir, adsorción utilizando una fase móvil que tiene una baja conductividad y elución utilizando un tampón de alta conductividad, como se comentó anteriormente. El experto en este campo puede ajustar fácilmente las condiciones sometiendo a ensayo diferentes condiciones y analizar el compuesto o los compuestos adsorbidos y el flujo continuo. En una realización específica, los compuestos deseados son anticuerpos.

Eligiendo entre la primera y la segunda realizaciones anteriores, el experto en este campo puede adaptarse fácilmente a las condiciones para adsorber un compuesto específico, de manera ventajosa mediante el control del pH y/o la conductividad. Por ejemplo, en la separación de anticuerpos, diferentes clases de anticuerpos tienen diferentes cargas y patrones de distribución de carga, que junto con el propósito de la separación decidirán si es más preferible adsorber los anticuerpos o dejarlos pasar por la columna sin ser adsorbidos.

Los anticuerpos separados de acuerdo con una realización de la presente invención pueden proceder de cualquier fuente conocida, tal como células cultivadas en una superficie o de cultivo celular discontinuo o continuo en tanques o recipiente de fermentación. Por lo tanto, en una realización, el líquido es un sobrenadante obtenido de la fermentación de células. Los ejemplos de los compuestos de los que necesitan ser separados los anticuerpos son en ese caso proteínas, ADN, virus, endotoxinas, nutrientes, componentes de un medio de cultivo celular, tales como agentes antiespumantes y antibióticos, e impurezas relacionadas con el producto, tales como especies mal plegadas y agregados. La etapa de contacto entre la fase móvil y la presente matriz de separación, es decir, la etapa de adsorción, puede estar precedida por una etapa de filtración mecánica, centrifugación y/o cromatografía. Por ejemplo, si la muestra líquida es un caldo de fermentación, es ventajoso eliminar mecánicamente los desechos celulares, las células enteras y otros componentes relativamente grandes antes de la etapa de utilización de la presente matriz.

En una realización, el presente método constituye la etapa de captura de un protocolo de purificación. En una realización específica, la muestra líquida es una carga bruta que se filtra antes del contacto con la matriz de cromatografía de acuerdo con la invención. En consecuencia, esta realización todavía constituiría una etapa de captura, a pesar de que la muestra líquida ha sido previamente purificada por medios mecánicos. Como es bien sabido, las células anfitrionas que producen anticuerpos también comprenderán otras diversas proteínas conocidas comúnmente como proteínas de la célula anfitriona (PCA). Tales PCA incluyen enzimas, tales como proteasas, y otras proteínas producidas por las células anfitrionas. Por lo tanto, en una realización, se eliminan sustancialmente todas las proteínas de la célula anfitriona de la muestra líquida mediante el presente método, por ejemplo mediante adsorción a la matriz de separación.

En realizaciones alternativas, el presente método se utiliza como una segunda, tercera o incluso cuarta etapa de cromatografía en un protocolo de limpieza, tal como una etapa de purificación o pulido intermedia. Por lo tanto, en una realización, la fase móvil aplicada a la presente matriz de separación comprende un eluato que contiene anticuerpo de una matriz de separación. En una realización, la muestra líquida es un eluato de una matriz de cromatografía de afinidad anterior. En una realización ventajosa, la matriz de separación de la que se obtiene el eluato comprende uno o más ligandos de la proteína de unión a Fc, tales como ligandos de Proteína A. El término ligandos de Proteína A incluye en este contexto proteína A nativa así como recombinante, o fragmentos funcionales de la misma. En este contexto, el término fragmento "funcional" significa un fragmento que conserva las propiedades de unión originales de la proteína. Tales matrices de afinidad están disponibles comercialmente, tal como MabSelect™ de GE Healthcare. En consecuencia, en esta realización, los compuestos extraídos, preferiblemente adsorbidos pueden ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en Proteína A liberada; complejos formados entre Proteína A y anticuerpos, tales como complejos de Proteína A-MAb, cuyos complejos pueden comprender varios anticuerpos por molécula de Proteína A, tal como 2-4 anticuerpos formando complejo con una molécula de Proteína A; y agregados de Proteína A liberada o anticuerpos. Como comprenderá el experto en este campo, dependiendo de las condiciones específicas utilizadas en la etapa anterior, tales como cromatografía de afinidad, el eluato puede necesitar acondicionamiento mediante adiciones o ajuste adecuados. Por lo tanto, el eluato se combina con un tampón o líquido adecuado para proporcionar una fase móvil.

El presente método es útil para separar cualquier anticuerpo monoclonal o policlonal, tal como anticuerpos procedentes de anfitriones mamíferos, por ejemplo, ratones, roedores, primates y seres humanos, o anticuerpos procedentes de hibridomas. En una realización, los anticuerpos separados son anticuerpos humanos o humanizados. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase, es decir, seleccionados del grupo que consiste en IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. En una realización, los anticuerpos son anticuerpos capaces de unirse a la proteína A, o fragmentos de anticuerpos que contienen Fc o proteínas de fusión. En una realización específica, los anticuerpos son inmunoglobulina G (IgG), tales como IgG1. En una realización, el presente método se utiliza para purificar anticuerpos que tienen un pI en el intervalo de 6-9, tal como en el intervalo de 7-8. En una realización específica, el pI de los anticuerpos purificados es de aproximadamente 9. En el presente contexto, se debe entender que el término "anticuerpos" también incluye fragmentos de anticuerpo y cualquier proteína de fusión que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Así, la presente invención también abarca la separación de fragmentos de uno cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados, así como proteínas de fusión que comprenden tales anticuerpos. En una realización, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. En una realización específica, los anticuerpos son anticuerpos humanizados.

Como se desprende de lo anterior, en el presente método, se recupera una fracción sustancialmente pura de anticuerpos no adsorbidos. En este contexto, se entiende que el término "sustancialmente puro" significa que se han eliminado sustancialmente todos los compuestos que no son anticuerpos. Más ventajosamente, se retira en la presente matriz de separación al menos aproximadamente 80%, tal como al menos aproximadamente 95%, es decir, en el intervalo de 95 a 100%, tal como al menos aproximadamente 98%, es decir, en el intervalo de 98 a 100% y preferiblemente al menos aproximadamente 99%, es decir, en el intervalo de 99-100%, de la cantidad total de contaminantes. Sin embargo, como el experto en este campo apreciará, la pureza obtenida dependerá de la concentración de anticuerpo en la muestra líquida aplicada a la matriz de separación, así como de otras condiciones utilizadas. Por lo tanto, en una realización, los anticuerpos separados de acuerdo con el presente método son anticuerpos de grado terapéutico. De este modo, los anticuerpos purificados de acuerdo con la invención son útiles en la investigación y también para la preparación de productos farmacéuticos de anticuerpos, tales como fármacos de MAb. Un uso alternativo de los anticuerpos purificados es para uso diagnóstico. Adicionalmente, los anticuerpos purificados son también útiles en productos alimenticios tales como aditivos de alimentos para seres humanos. Por ejemplo, los anticuerpos de especie bovina purificados de acuerdo con la presente invención son útiles en productos alimenticios.

En una realización específica del presente método, la presente matriz de separación se proporciona como una columna de cromatografía desechable o un filtro desechable. Una ventaja de la utilización de productos desechables en un método para la purificación de compuestos terapéuticos tales como anticuerpos es que permite evitar la contaminación cruzada entre dos procedimientos diferentes. Por lo tanto, en una realización, la presente matriz de separación se proporciona como una columna de cromatografía o filtro estériles. En una realización, el presente método se lleva a cabo como un procedimiento discontinuo, en el que se añade una matriz de separación desechable a un recipiente que comprende el líquido del que se van a recuperar los anticuerpos. Se permite un tiempo adecuado para que los compuestos de interés se fijen a la matriz, después de lo cual la fase líquida que

comprende los anticuerpos se retira del recipiente. La matriz utilizada puede desecharse a continuación, sin liberar los compuestos adsorbidos, lo que de nuevo puede ser ventajoso desde un punto de vista de seguridad ya que no se necesita manipular nuevamente compuestos tales como endotoxinas y/o ciertas proteínas de la célula anfitriona. En una realización alternativa, la presente matriz se proporciona como un producto desechable en una columna de cromatografía que se utiliza en un modo en el que los anticuerpos son adsorbidos. En una realización ventajosa, la columna y la matriz han sido esterilizadas, lo que permite al usuario purificar el producto de anticuerpo en condiciones asépticas o incluso estériles.

También se hace referencia a un kit para la purificación de anticuerpos a partir de uno o más de otros componentes en un líquido, cuyo kit comprende en compartimentos separados una columna de cromatografía empaquetada con una matriz de separación como se describió anteriormente; uno o más tampones; e instrucciones por escrito. La matriz de separación puede ser la que se ha descrito anteriormente. Dichas instrucciones describen ventajosamente un método como se ha definido anteriormente en detalle.

Descripción detallada de los dibujos

La Figura 1 muestra el ligando prototipo N-bencil-N-metil etanolamina inmovilizado a través del átomo de nitrógeno en un soporte en forma de una esfera. El ligando unido se muestra a la izquierda con el conector dibujado esquemáticamente; y a la derecha con un conector hidrófilo ilustrativo. En la parte experimental, el ligando prototipo se acopló a la matriz de agarosa al 6% Sepharose™ 6 FF (GE Healthcare, Uppsala, Suecia).

La Figura 2 presenta un cromatograma de muestra que contiene 50 mg de Mab1 aplicado a matrices de separación que comprenden ligandos de N-bencil-N-metil etanolamina inmovilizados sobre Sepharose™ 6 FF (901035A); N,N-dimetilbencilamina (ejemplo de referencia) inmovilizada sobre Sepharose 6 FF; y Q Sepharose™ FF en Bis-Tris 25 mM, NaCl 100 mM (~ 12 mS/cm), pH 6,5. La elución se realizó con Bis-Tris 25 mM, NaCl 0,5 M, pH 6,5.

Las Figuras 3 a) y b) muestran los resultados de la cromatografía llevada a cabo en prototipos con mAb1-rProteína A. El tampón A fue Bis-Tris 25 mM, NaCl 50 mM, pH 6,0. La conductividad fue de aproximadamente 7 mS/cm. El tampón B, acetato de sodio 0,5 M, pH 4,0, se utilizó para la elución. La velocidad de flujo fue de 0,5 ml/min (150 cm/h). La muestra fue de 10 mg de mAb1, 0,10 mg de rPrA a una concentración de mAb1 de 4 mg/ml y rProteína A al 1% (p/p). 3a) ref. Q Sepharose™ FF; y b) N-bencil-N-metiletanolamina, 146 µmoles/ml (901035A).

Las Figuras 4 a)-c) muestran los resultados de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) analítica en la muestra con MAb 1, rPrA al 1% y las fracciones de flujo continuo y de eluato agrupadas de las rondas cromatográficas en la figura 3. La curva de color azul son las fracciones de flujo continuo (FT) y el color rojo es el eluato. Más específicamente, la Figura 4a) presenta una muestra de mAb1 de 4 mg/ml, rPrA 0,04 mg/ml que proporciona 1% (p/p); 4b) muestra FT y el eluato de la fig. 3a) Q Sepharose™ FF; y 4c) muestra FT y eluato de la fig. 3b) N-bencil-N-metiletanolamina, 146 µmoles/ml (901035A).

Parte experimental

Los presentes ejemplos se proporcionan sólo a efectos ilustrativos, y no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la invención como se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Preparación de la matriz de separación de acuerdo con la invención

Preparación de BMEA Sepharose Fast Flow

Una realización del método de preparación de una matriz de separación de acuerdo con la invención se muestra a continuación, a partir de un gel de agarosa entrecruzado (Sepharose™ 6 Fast Flow, GE Healthcare, Uppsala, Suecia).

A. Introducción de grupo alilo en la matriz

Se activó Sepharose 6 Fast Flow con alil glicidil éter de la siguiente manera: se secaron mediante succión 100 ml de Sepharose 6 Fast Flow, se mezclaron con 0,3 g de NaBH₄, 12 g de Na₂SO₄ y 35 ml de solución acuosa al 50% de NaOH. La mezcla se agitó durante 1 hora a 50°C. Después de la adición de 100 ml de alil glicidil éter la suspensión se dejó a 50°C con agitación vigorosa durante 16 horas adicionales. Después de la filtración de la mezcla, el gel se lavó sucesivamente, con 500 ml de agua destilada, 500 ml etanol, 200 ml de agua destilada, 200 ml de ácido acético 0,2 M, y 500 ml de agua destilada.

La titulación proporcionó un grado de sustitución de 0,22 mmoles de alilo/ml de gel.

B. Activación de alil Sepharose 6 Fast Flow a través de bromación

Se añadió bromo a una suspensión agitada de 50 ml de Sepharose 6 Fast Flow activada con alilo (0,22 mmoles de grupos alilo/ml de gel drenado), 1 g de acetato de sodio y 15 ml de agua destilada, hasta que se obtuvo un color amarillo persistente. A continuación se añadió formiato de sodio hasta que la suspensión se decoloró completamente. La mezcla de reacción se filtró y el gel se lavó con 500 ml de agua destilada. El gel activado se

transfirió directamente a un recipiente de reacción y se hizo reaccionar adicionalmente con N-bencil-N-metiletanolamina.

C. Introducción de grupos BMEA (N-bencil-N-metiletanolamina) en la matriz activada

5 Los grupos amina se introdujeron en la matriz directamente a través del átomo de nitrógeno de los grupos amina. En un procedimiento típico, el acoplamiento a la matriz se realizó a través de bromación del grupo alilo y sustitución nucleofílica en condiciones alcalinas. Se transfirieron 25 ml de gel activado con bromo (0,22 mmoles de grupos alilo/ml de gel drenado) a un vial de reacción que contenía una solución de N-bencil-N-metiletanolamina (16,0 ml). Se añadieron 5 ml de agua y el pH de la solución de reacción se ajustó a 12,0 con una solución de hidróxido de sodio. La reacción se dejó durante 16 horas agitando a 50°C. Después de la filtración de la mezcla de reacción el gel se lavó sucesivamente con 3 x 10 ml de agua destilada, 3 x 10 ml de HCl acuoso 0,5 y finalmente 3 x 10 ml de agua destilada. El gel BMEA Sepharose Fast Flow se obtuvo con un grado de sustitución de 0,15 mmoles de aminas/ml de gel.

Ejemplo 2: Purificación de los anticuerpos en el flujo continuo

Ejemplo 2A) Disposición

15 En condiciones en las que no se producía unión, las muestras que contenían aproximadamente 50 mg de mAb1 se cargaron en el prototipo 901035 A (N-bencil-N-metil etanolamina) a aproximadamente 5 y 12 mS/cm. Las fracciones de flujo continuo (FT) se recogieron a los 5, 10 y 15 volúmenes de la columna (CV). Las fracciones del pico de elución se reunieron. Las fracciones de FT se analizaron para determinar el contenido de PCA y Proteína A.

20 Para confirmar que el rendimiento cromatográfico no era único para un mAb concreto, los ciclos cromatográficos se repitieron utilizando una muestra que contenía mAb2 a pH 6,0 y aproximadamente 12 mS/cm. El rendimiento del prototipo se evaluó primero con SEC analítica. Las fracciones seleccionadas se analizaron para determinar el contenido de PCA y proteína A. Después del escrutinio las fracciones con fracciones de SEC seleccionadas se enviaron para el análisis de PCA y Proteína A.

25 Para someter a ensayo de aclaramiento de rProteína A del prototipo, el MAb1 se enriqueció con proteína A recombinante (rPrA) al 1% (p/p). Al prototipo se le inyectó un volumen de muestra correspondiente a 10 mg de MAb1, rProteína A al 1% a pH 6,0 y una conductividad de aproximadamente 7 mS/cm. Las fracciones de flujo continuo y de eluato se agruparon por separado y se analizaron mediante SEC.

Materiales/unidades investigadas

Las columnas y los geles se obtuvieron de GE Healthcare, Uppsala, Suecia

HiPrep™ 26/10 Desalinización	núm. cat. 17-5087-01	CV = 53,09 ml
Tricorn™ 5/50	núm. cat. 18-1163-09	CV = 1 ml
HR 5/5™	núm. cat. 18-0338-01	CV = 1 ml
Superdex™ 200 10/300 GL,	núm. cat. 17-5175-01	CV = 23,56 ml

30 Aparatos

sistemas de cromatografía:	ÅKTAexplorer™ 10
espectrofotómetro	Spectra MAX plus

Productos químicos

Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico. El agua fue filtrada mediante MilliQ.

Medios de cromatografía

35 Q Sepharose™ Fast Flow (FF) (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Los ligandos de las matrices de separación son prototipos como se describe en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Ligando

Ref. prototipo	Ligando	Capacidad Cl ⁻ (µmoles/ml)
901035A	N-bencil-N-metil etanolamina	146

Muestras

5 Se utilizaron dos anticuerpos IgG humanizados diferentes, de la subclase 1, indicados como MAb 1 y Mab 2, con un coeficiente de extinción de 1,46 y 1,50 respectivamente. Ambos anticuerpos se expresaron en cultivos CHO y posteriormente se purificaron utilizando cromatografía de afinidad con Proteína A convencional antes de los presentes experimentos.

10 **El cambio de tampón** se realizó en una columna HiPrep™ de desalinización (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), equilibrada con el tampón de interés, mediante la inyección de un volumen apropiado (5-15 ml) con un Superloop™ (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). La velocidad de flujo fue de 5 ml/min y se recogieron fracciones de 5 ml. Las fracciones que contenían el pico eluido se agruparon y se determinó la absorbancia a 280 nm por duplicado, con el fin de calcular la concentración de acuerdo con la ecuación 1:

$$A_{280} = \epsilon \cdot C \cdot l \quad (\text{Ecn. 1})$$

15 en donde A_{280} es la absorbancia a 280 nm.

ϵ (ml*mg⁻¹*cm⁻¹) es el coeficiente de extinción para una proteína concreta.

C (mg/ml) es la concentración de la proteína.

l (Cm) es la longitud del recorrido.

20 La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se llevó a cabo en una columna Superdex™ 200 10/300 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. El tampón fue PBS (solución salina tamponada con fosfato); fosfato 10 mM, NaCl 0,137 M, KCl 2,7 mM, pH 7,4 preparado a partir de comprimidos (Sigma, P-4417).

Método

Equilibrado	2/0,1 CV; 2 CV utilización por primera vez;	0,1 CV entre las rondas
inyección de la muestra	50 µl	
Elución isocrática	1,5 CV	

Cromatografía en prototipos con mAb

25 El tampón A fue Bis-Tris 25 mM, pH 6,0 o 6,5. Dependiendo de la conductividad deseada, aproximadamente 5 o 12 mS/cm, se incluyó NaCl 35 o 100 mM. El tampón de elución (tampón B) fue Bis-Tris 25 mM, NaCl 0,5 M, pH 6,5. La velocidad de flujo de 0,5 ml/min (150 cm/h).

Método:

Equilibrado	5 CV	tampón A
Inyección de la muestra	5-25 ml	cont de muestra. 20 o 50 mg de mAb
Lavado	5 CV	tampón A
Elución en Gradiente	10 CV	tampón B al 0-100%
Elución	10 CV	tampón B al 100%
Regeneración	5 CV	tampón A

Cromatografía en prototipos con MAb-rProteína A

5 El tampón A fue Bis-Tris 25 mM, pH 6,0. La conductividad fue de aproximadamente 7 mS/cm mediante la adición de NaCl 50 mM, el tampón B fue acetato de sodio 0,5 M, pH 4,0. La velocidad de flujo fue de 0,5 ml/min (150 cm/h). La concentración de la muestra fue MAb 4 mg/ml rPrA 1 a 0,04 mg/ml proporcionando 1% (p/p).

Método:

Equilibrado	5 CV	tampón A
Inyección de la muestra	2,5 ml	10 mg MAb, rPrA al 1%
Lavado	5 CV	tampón A
Elución en gradiente	10 CV	tampón B al 0-100%
Elución	10 CV	tampón B al 100%
Regeneración	5 CV	tampón A

CIP (limpieza in situ)

10 Después de cada serie cromatográfica, el prototipo y la matriz de referencia Q Sepharose™ FF se sometieron al siguiente procedimiento CIP;

Isopropanol al 30%	5 CV (Volúmenes de Columna)
H ₂ O	5 CV
NaOH 1,0 M	4 CV (incl. pausa de 15 min.)
H ₂ O	5 CV
tampón A	5 CV
H ₂ O	5 CV
EtOH al 20%	5 CV

Análisis de Proteína A

15 Las fracciones seleccionadas se mezclaron con diluyente de la muestra SPA en proporciones de 800 µl de diluyente de la muestra SPA + 200 microlitros de muestra. Después de mezclar, las fracciones se calentaron en un bloque de calentamiento a 99°C durante 10 minutos, a continuación se mezclaron de nuevo. Las muestras se analizaron a continuación para determinar la proteína A recombinante.

Análisis de proteínas de las células anfitrionas (PCA)

Las muestras (min. 600 µl) se analizaron para determinar el contenido de PCA. El límite inferior de detección es de 10 ng/ml.

20 Ejemplo 2B) Muestra que contiene MAb1 purificada en ligandos prototipo de N-bencil-N-metiletanolamina (901035A)

La muestra que contenía 50 mg de MAb1 se aplicó a N-bencil-N-metil etanolamina inmovilizada sobre Sepharose™ 6 FF (901035A) preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior y la matriz de referencia Q Sepharose™ FF en Bis-Tris 25 mM, NaCl 100 mM (~ 12 mS/cm), pH 6,5. La elución se llevó a cabo con Bis-Tris 25 mM, NaCl 0,5 M, pH 6,5.

Los cromatogramas del ejemplo 2 se muestran en la Figura 2, que muestra el prototipo de Sepharose™ 6 FF (901035A) con N-bencil-N-metil etanolamina en comparación con Q Sepharose™ FF. Las fracciones de flujo continuo (FT) seleccionadas para el análisis se indican con flechas. Los resultados para el aclaramiento de PCA y Proteína A que se muestran en las tablas 2 y 3 a continuación revelan que el prototipo es superior a Q Sepharose™ FF a este respecto.

5

Tabla 2: Resultados de los análisis de PCA

Columna	pH	Inicio (ng/ml)	FT1 (ng/ml)	FT2 (ng/ml)	FT3 (ng/ml)
Q Sepharose™ FF (ref)	6,5	890	160	200	180
N-bencil-N-metiletanolamina, 146 µmoles/ml (901035A)	6,5	890	10	20	35

Tabla 3: Resultados del análisis PRA

Columna	pH	Inicio (ng/ml)	FT1 (ng/ml)	FT2 (ng/ml)	FT3 (ng/ml)
Q Sepharose™ FF (ref)	6,5	0,40	0,69	0,46	0,31
N-bencil-N-metiletanolamina, 146 µmoles/ml (901035A)	6,5	0,40	0	0	0

10 Ejemplo 3:

Purificación de MAb1 en el flujo continuo de una muestra que comprende MAb1 y proteína A recombinante (rPrA) en el ligando prototipo de N-bencil-N-metiletanolamina

15

En este ejemplo, se llevó a cabo la cromatografía sobre prototipos con una muestra que contenía mAb1-rProteína A. El tampón A fue Bis-Tris 25 mM, NaCl 50 mM, pH 6,0. La conductividad fue de aproximadamente 7 mS/cm. El tampón B fue acetato de sodio 0,5 M, pH 4,0. La velocidad de flujo fue de 0,5 ml/min (150 cm/h). La muestra fue de 10 mg mAb1, 0,10 mg de rPrA a una concentración de mAb1 de 4 mg/ml y rProteína A al 1% (p/p). Los resultados se muestran en la Figura 3.

20

Por último, se realizaron SEC analíticas sobre la muestra con mAb1, rPrA al 1% y fracciones del flujo continuo y del eluato reunidas de las rondas cromatográficas de la figura 4. Los resultados se muestran en la Figura 4. En la Figura 4a, el pico sombreado es el complejo de MAb1-Proteína A. La curva de color azul son las fracciones de flujo continuo (FT) y la de color rojo es el eluato.

Ejemplo 4: Modo de adsorción

4A) Disposición

25

Para someter a ensayo la selectividad de BMEA Sepharose Fast Flow (BMEA; N-bencil-N-metiletanolamina) se sometió a ensayo en el modo de adsorción el tiempo de retención de la IgG humana y ocho proteínas diferentes. Los resultados se compararon con un intercambiador de aniones Q Sepharose Fast Flow disponible en el mercado. El principio del método de ensayo fue que las proteínas se inyectaron en una columna HR5/5 (que contenía los ligandos inmovilizados sobre BMEA Sepharose Fast Flow™) equilibrada con el tampón A (que contenía piperazina como componente del tampón). Se utilizó un gradiente de sal para la elución de las proteínas (véase el método a continuación).

30

Materiales/Unidades investigadas

Las columnas y Q Sepharose Fast Flow se obtuvieron de GE Healthcare, Uppsala, Suecia.

HR de 5/5™: núm. de cat 18-0338-01	Volumen de la Columna (CV = 1 ml)
------------------------------------	-----------------------------------

Aparato

35 Sistemas de cromatografía: ÄKTAexplorer™ 10

Productos químicos y muestras

5 La proteínas, ovoalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina de suero bovino, α -lactalbúmina, mioglobina, lactoferrina, ribonucleasa A y citocromo C se adquirieron de Sigma y la IgG humana (Gammanorm) se adquirió de Octapharma. Las proteínas se disolvieron en los tampones A a una concentración de 1-10 mg/ml. Q Sepharose Fast Flow se obtuvo de GE Healthcare, Uppsala Suecia. Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico y el agua utilizada se filtró mediante MilliQ.

Cromatografía

10 Las columnas se equilibraron con el tampón A a una velocidad de flujo de 0,6 ml/min antes de aplicar 100 μ l de la solución de muestra. Sólo se analizó una proteína cada vez. Las proteínas se eluyeron mediante un gradiente lineal de tampón A a tampón B con un volumen de gradiente de 21 volúmenes de columna (véase el método de más abajo). El tampón A fue piperazina 25 mM, pH 10,0 y el tampón B fue piperazina 25 mM, NaCl 1,0 M, pH 10,0. Se detectó la absorbancia a 280 nm durante todas las rondas.

Método:

Equilibrado:	5 CV de tampón A
Inyección de la muestra:	100 μ l (aprox 0,2 mg de proteína)
Gradiente:	21 CV de tampón B al 100%
Equilibrado después del gradiente:	5 CV de tampón A

15 Resultados

Para documentar si el ligando BMEA interactúa selectivamente con las inmunoglobulinas, se aplicó IgG humana a una columna de 1 ml (HR 5/5) cargada con el nuevo medio. Además, también se aplicaron las proteínas ovoalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina de suero bovino, α -lactalbúmina, mioglobina, lactoferrina, ribonucleasa A y citocromo C. Los resultados se compararon con los tiempos de retención de las proteínas observadas para Q Sepharose Fast Flow. Q Sepharose Fast Flow es un fuerte intercambiador de aniones y se utiliza como intercambiador de aniones de referencia, ya que tiene la misma matriz de soporte (material de soporte, tamaño de esfera, tamaños de poro, volumen de poro, procedimiento de carga, etc.) y tiene esencialmente el mismo grado de sustitución (medido como capacidad de intercambio iónico). Como se desprende de la Tabla 1 BMEA Sepharose Fast Flow retardó todas las proteínas investigadas con más fuerza en comparación con Q Sepharose Fast Flow. Además, IgG fue la proteína que proporcionó el tiempo de retención más largo con BMEA Sepharose Fast Flow (Tabla 1). Esto refleja una unión mucho más fuerte al medio BMEA que a Q Sepharose Fast Flow. En comparación con Q Sepharose Fast Flow el tiempo de retención de IgG aumentó 27,3 min cuando se utilizó BMEA Sepharose Fast Flow (Tabla 1). Estos resultados indican claramente que BMEA Sepharose Fast Flow se puede utilizar para capturar y eluir IgG de una manera selectiva.

30 Tabla 1. Tiempo de retención (t_r) de diferentes proteínas en Q Sepharose Fast Flow y BMEA Sepharose Fast Flow.

Proteína	Peso molecular	pI	t_r en Q Sepharose Fast Flow (min)	t_r en BMEA Sepharose Fast Flow (min)	Δt_r (t_r BMEA - t_r Q)
Citocromo C	12400	9,6	15,3	16,8	1,5
Ribonucleasa A	13700	9,4	15,8	22,6	6,8
Lactoferrina	75000	7,9	15,1	19,4	4,3
Mioglobina	17600	7,2	16,1	20,5	4,4
IgG humana	160000		16,5	43,8	27,3
α -Lactalbúmina	14400	5,2	24,6	40,3	15,7

ES 2 612 572 T3

Proteína	Peso molecular	pI	t _r en Q Sepharose Fast Flow (min)	t _r en BMEA Sepharose Fast Flow (min)	Δt _r (t _r BMEA - t _r Q)
Albúmina de suero bovino	69000	5,1	25,3	32,6	7,3
β-Lactoglobulina	35000	5,1	25,1	37,1	12,0
β-Lactoglobulina	35000	5,1	30,0 ^x	37,1	7,1
Ovoalbúmina	43500	4,7	21,8	30,8	9,0
na = no analizado, ^x Se observaron dos picos					

REIVINDICACIONES

1. Una matriz de separación que comprende una pluralidad de ligandos de cromatografía definidos por la siguiente fórmula



5 acoplados a un soporte a través del grupo amina, en donde

R_1 es un grupo fenilo no sustituido;

R_2 es $-CH_2-$;

R_3 es $-CH_3$;

R_4 es $-CH_2-CH_2-CH_2-$ o $-CH_2-CH_2-$; y

10 R_5 es OH.

2. Una matriz de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el soporte comprende partículas, tales como partículas esféricas.

3. Una matriz de separación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el soporte comprende una estructura membranosa.

15 4. Un método de preparación de una matriz de separación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, cuyo método comprende inmovilizar una pluralidad de ligandos en un soporte.

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 en donde el soporte es poroso.

6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en donde el soporte se prepara a partir de un material orgánico.

20 7. Un método de separación de uno o más anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo de uno o más de otros compuestos en una muestra líquida, en donde se pone en contacto una fase móvil que comprende dichos anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo y el compuesto o los compuestos con una matriz de separación de acuerdo con la reivindicación 1.

25 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la matriz de separación se proporciona en una columna de cromatografía, la fase móvil se hace pasar a través de dicha columna por gravedad y/o bombeo, y los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo se recuperan en el flujo continuo de la columna.

30 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde la muestra líquida comprende un sobrenadante obtenido a partir de la fermentación de células.

10. Un método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde el contacto con la matriz de separación es precedido por una etapa de filtración mecánica y/o cromatografía.

11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en donde la muestra líquida comprende una carga bruta.

35

Figura 1

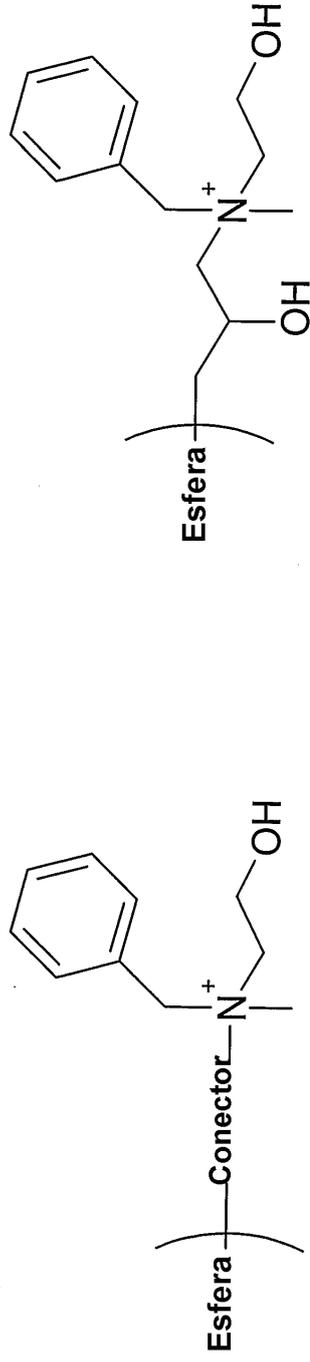


Figura 2

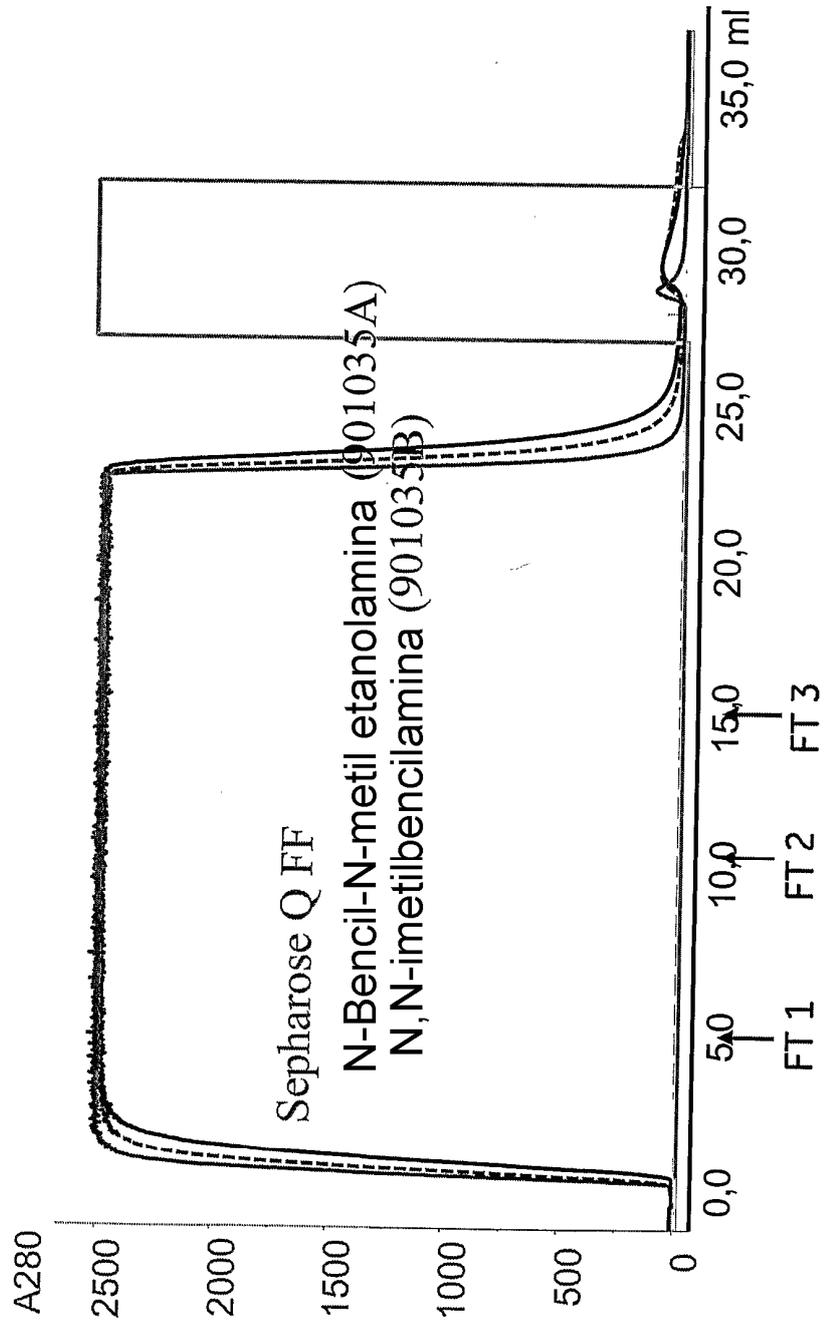


Figura 3a

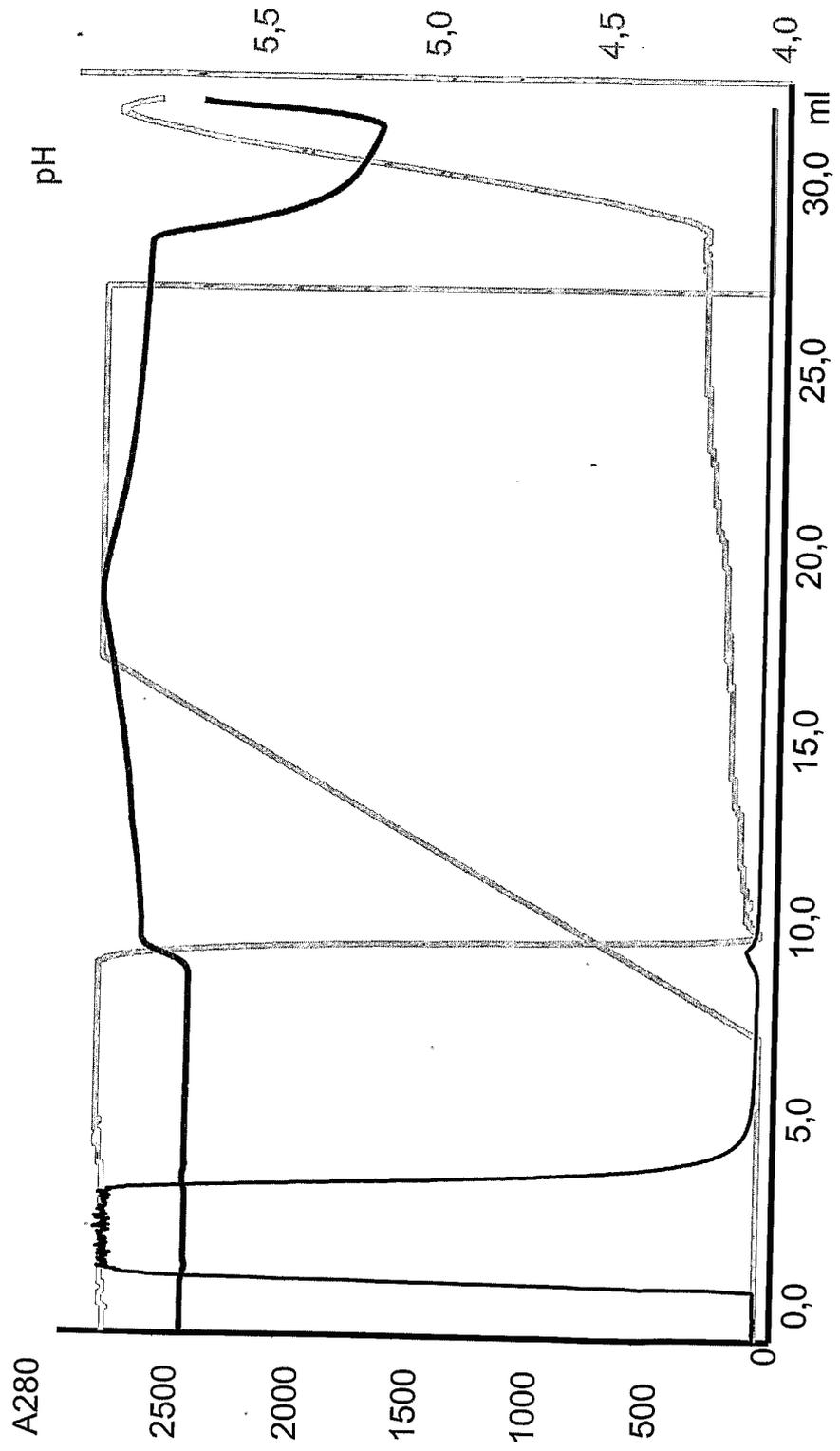


Figura 3b

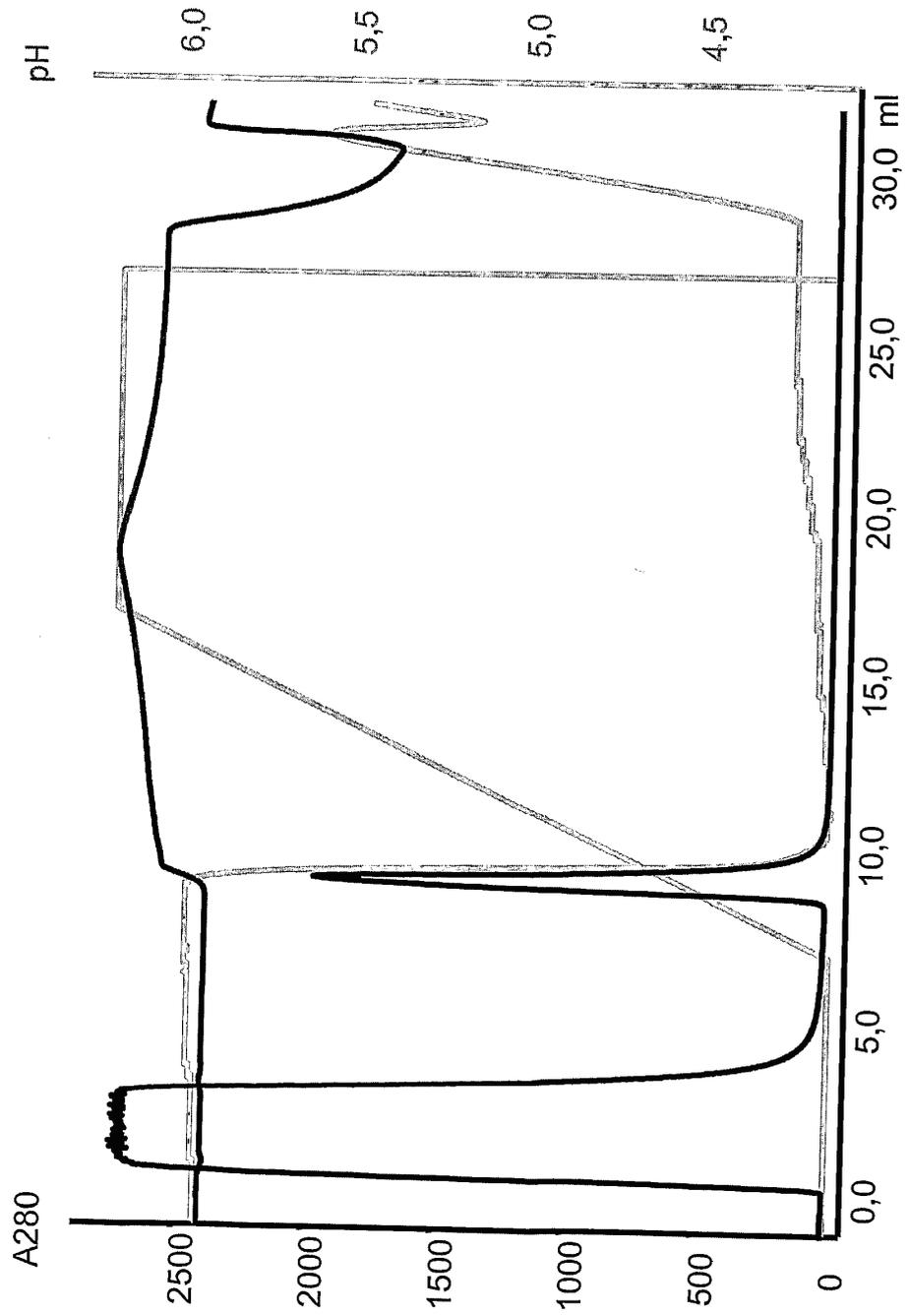
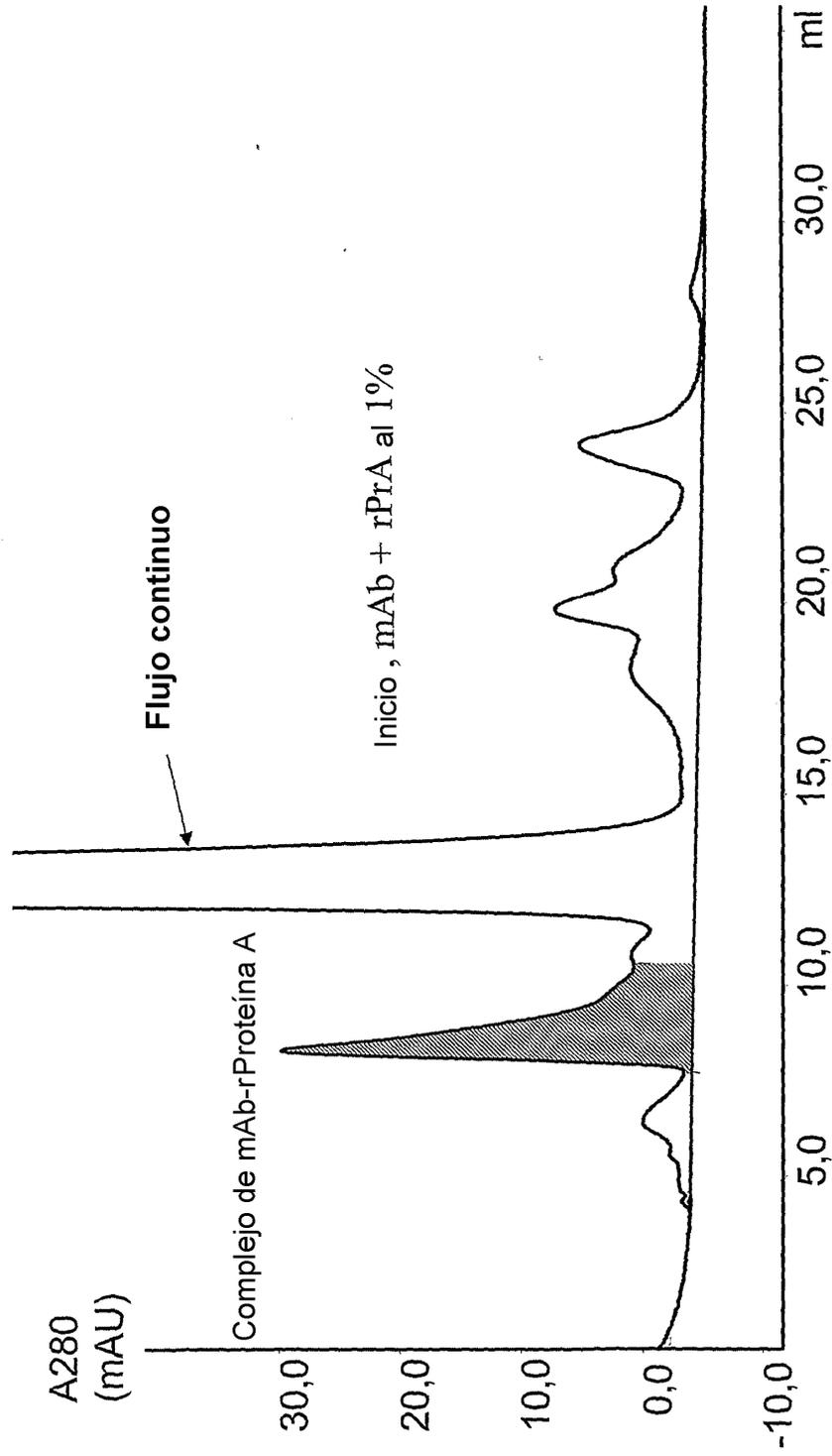


Figura 4a



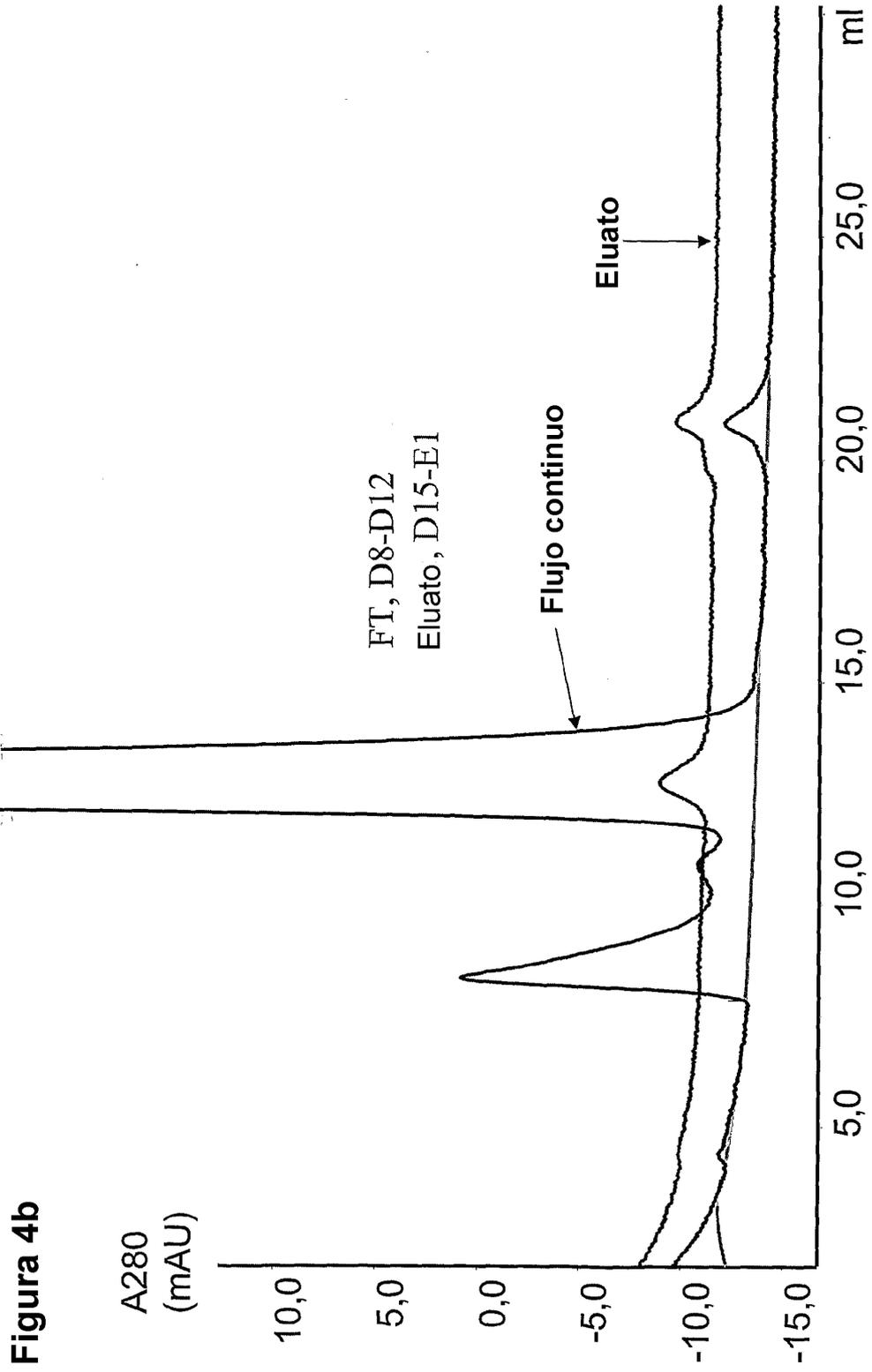


Figura 4b

