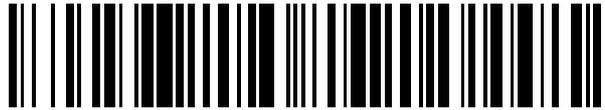


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 042**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

C12N 11/08 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

B01J 20/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.01.2007 PCT/US2007/000366**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2017 WO07081851**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2007 E 07716413 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 1974215**

54 Título: **Matrices cromatográficas de afinidad y métodos de fabricación y utilización de las mismas**

30 Prioridad:

06.01.2006 US 756873 P

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

05.04.2018

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
290 Concord Road
Billerica, MA 01821, US**

72 Inventor/es:

**BIAN, NANYING;
CHARKOUDIAN, JOHN;
SOICE, NEIL;
UMANA, JOAQUIN y
WANG, CHEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 662 042 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

Matrices cromatográficas de afinidad y métodos de fabricación y utilización de las mismas

5 Descripción de la InvenciónCampo de la Invención

10 La invención se refiere en general al campo de la cromatografía. Más específicamente, la invención se refiere a un método de acoplamiento de un ligando proteico a un soporte sólido, a una matriz cromatográfica de afinidad, así como al uso de dicha matriz cromatográfica de afinidad en un método de purificación de una molécula diana a partir de una mezcla.

Antecedentes de la Invención

15 Los métodos cromatográficos se usan en general para separar y/o purificar moléculas de interés tales como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos a partir de una mezcla. Específicamente, la cromatografía de afinidad conlleva hacer pasar la mezcla a través de una matriz que tiene un ligando específico (es decir, un compañero de unión específico) de la molécula de interés unido a ella. Tras entrar en contacto con el ligando, la molécula de interés se une a la matriz y así queda retenida sacándola de la mezcla. La cromatografía de afinidad proporciona ciertas ventajas con respecto a otros tipos de cromatografía. Proporciona un método de purificación que es altamente específico, rápido, económico y de elevado rendimiento.

20 En una de las aplicaciones, la cromatografía de afinidad se puede usar para purificar proteínas, tales como anticuerpos monoclonales. Como ejemplo, anticuerpos del subtipo de IgG se pueden purificar por afinidad haciéndolos pasar a través de una matriz que tiene proteína A o proteína G unida a ella (Boyle y Reis, 1987, *Biotechnology* 5:697; Hermanson et al., 1992, *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press; publicación de patente de Estados Unidos n.º 2006/0134805).

25 Se han descrito con anterioridad métodos de fijación de ligandos proteicos, tales como proteína A y proteína G a un soporte sólido, por ejemplo, medios cromatográficos, véanse, por ejemplo, de Hermanson et al. 1992, *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press; las Patentes de Estados Unidos n.º 5.874.165; 3.932.557; 4.772.635; 4.210.723; 5.250.613; la Solicitud de Patente Europea EP 1 352 957 A1, WO 2004/074471. Típicamente, el medio se activa con un grupo funcional reactivo ("grupo activado"), tal como un epóxido (epiclorhidrina), cianógenos (bromuro de cianógeno (CNBr)), carbonato de N,N-disuccinimidilo (DSC), aldehído o un ácido carboxílico activado (por ejemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS), ésteres activados con carbonildiimidazol (CDI)). Estos grupos activados se pueden fijar directamente a la matriz de base, como en el caso del CNBr, o pueden formar parte de un "enlazador" (*linker*) o molécula espaciadora la cual es típicamente una cadena lineal de átomos de carbono, oxígeno y nitrógeno, tal como la cadena de diez miembros de carbono y oxígeno que se encuentra en el enlazador éter diglicidílico de butanodiol (un agente de acoplamiento epóxido común). A continuación, el medio activado se equilibra con el ligando proteico bajo condiciones de acoplamiento. Una vez que ha finalizado la reacción de acoplamiento, el medio se lava minuciosamente. Para la Proteína A, se pueden cargar, típicamente, entre 4 y 6 mg de proteína (densidad de ligando) por cada ml de medio, dando como resultado una capacidad estática máxima de IgG (Qs) de 40 g/L. La densidad de ligando proteico determina la capacidad estática. La capacidad estática proporciona un límite superior de la capacidad proteica que se puede usar durante la separación cromatográfica. En general, la capacidad dinámica o de carga (Qd) correlaciona la capacidad estática con un medio dado.

30 Se ha descrito también una forma recombinante de proteína A adecuada para la fijación a un soporte de agarosa. La forma recombinante de la proteína se modifica para tener una cisteína terminal, véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.399.750; *GE Healthcare Product Literature for r-Protein A Sepharose Fast Flow, Mabselect® and Mabselect Xtra®*. Usando esta Proteína A recombinante, se han alcanzado capacidades estáticas de IgG que van de 55 a 70 g/L. No obstante, una de las limitaciones asociada al uso de este ligando de proteína A recombinante es que se debe modificar genéticamente para que contenga la funcionalidad de acoplamiento selectiva, lo cual puede consumir mucho tiempo y resultar económicamente costoso.

35 Otra de las estrategias para el acoplamiento de un ligando proteico a un soporte sólido es el "acoplamiento asistido por enlazador". El acoplamiento asistido por enlazador, por contraposición al acoplamiento asistido por ligando que se describe de forma detallada posteriormente, se caracteriza por su dependencia de una única molécula que incluye tanto el ligando (es decir, el compañero de unión específico de la molécula diana a purificar) como una funcionalidad asociativa adecuada que puede ayudar en el acoplamiento de ligando al soporte sólido. Esta técnica conlleva la modificación de un grupo funcional (tal como una amina cargada) en un enlazador o espaciador diseñado para acoplar el ligando proteico de interés. En estos sistemas, el enlazador posee también un grupo activado para acoplar la proteína al enlazador. El enlazador se asocia primero con el soporte sólido y, a continuación, se hace entrar en contacto con proteína. Por lo tanto, el enlazador de una sola molécula ejerce la función dual de fijar de manera covalente la proteína a la matriz e interaccionar de forma no covalente con la proteína. Esto aporta cierta pre-asociación de las entidades antes/durante la reacción de acoplamiento. Esta técnica se aprovechó para acoplar glicanos a una superficie de membrana con vistas a una transferencia a membrana, de geles de electroforesis

(patente de Estados Unidos n.º 5.543.054; Charkoudian et al., 1995, *Analytical Letters*, 28:1055).

Otro ejemplo de acoplamiento asistido por enlazador se encuentra en el producto comercial Affi-Gel 15® (BioRad, Hercules, CA). Affi-Gel 15® es un soporte de agarosa derivatizado con un ácido carboxílico activado con NHS como parte de un brazo enlazador que contiene una funcionalidad cargada positivamente. La funcionalidad cargada positivamente es una amina secundaria. Esta amina se protona a un pH 7,4 y permite el acoplamiento de proteínas con un punto isoelectrónico (pI) inferior a 6. Las propiedades de la matriz de Affigel, y otros ligandos de este tipo creados mediante acoplamiento asistido por enlazador, presentan limitaciones debido a que el grupo asociativo (carga positiva) forma parte del enlazador de acoplamiento proteico alcanzando una relación fija de 1:1 de las dos funcionalidades. En la patente de Estados Unidos n.º 5.260.373 se describe otro brazo enlazador cargado, para acoplar Proteína A a agarosa. En este caso, para facilitar el acoplamiento proteico a un soporte de agarosa se usa un brazo enlazador más corto compuesto por arginina. El enlazador de arginina se activa con NHS y es portador de una carga positiva. No obstante, los resultados sugieren que solamente se logra una modesta mejora en la capacidad de unión de la IgG en comparación con el acoplamiento no asistido por enlazador. Por otra parte, la relación de 1:1 antes descrita se mantiene también en este caso. Recientemente, en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 10/928.731, se ha descrito Proteína A unida a un soporte sólido por medio de un enlazador.

El aumento a escala de los métodos de fermentación y cultivo tisular, por ejemplo, para la producción de anticuerpos monoclonales, ha dado como resultado tanto el aumento de volúmenes como el aumento de concentraciones de moléculas diana producidas mediante estos métodos. Las concentraciones de productos que superan un gramo por litro no son inhabituales. Estos productos requieren una purificación antes de que se puedan comercializar. Por consiguiente, existe la necesidad de una matriz cromatográfica que posea una capacidad de unión mejorada que proporcione un buen rendimiento del producto, y la cual sea económica y sencilla de fabricar. Varias de las realizaciones de la invención que se describen a continuación satisfacen estas y otras necesidades.

El documento EP 1 352 957 A1 da a conocer un portador para la inmovilización covalente multipunto de enzimas en una superficie hidrófila gracias a una adsorción iónica inicial. Para lograr dicha inmovilización covalente multipunto, el portador tiene una capa interior de grupos próticos y una capa exterior de grupos epóxido dispuestos en su superficie, en donde los grupos próticos y los grupos epóxido están contenidos en la misma cadena de hidrocarburos.

Catimel et al. (*J. Chromatography* 1997, 776(1), 15-30) describen la interacción entre el anticuerpo monoclonal A33 humanizado y los fragmentos correspondientes de F(ab)₂' o Fab' con antígeno A33 epitelial colónico purificado. Para proporcionar antígeno A33 purificado, extractos de membrana de la línea celular de carcinoma colónico LIM 1215 se hicieron pasar a través de una matriz cromatográfica de afinidad que comprendía un soporte de agarosa con proteína A fijada de manera covalente al mismo.

Volke et al. (*Protein Express. Purif.* 1006, 50(1), 37-42) tratan la purificación de proteínas Tau bovinas mediante cromatografía de afinidad. Para reconocer todas las isoformas de *splicing* de Tau durante el proceso de purificación, se utiliza una matriz cromatográfica de afinidad que comprende sefarosa como soporte sólido y que tiene anticuerpo monoclonal BT-2 unido al soporte sólido.

SUMARIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método de acoplamiento de un ligando proteico a un soporte sólido, comprendiendo el método las etapas de:

- a) hacer entrar en contacto el soporte sólido con un grupo asociativo tal que el grupo asociativo se une de manera covalente al soporte sólido;
- b) activar el soporte sólido usando un grupo activador; y
- c) hacer entrar en contacto el soporte sólido con el ligando proteico, tal que el ligando proteico se une al soporte sólido activado e interacciona de manera no covalente con el grupo asociativo de a);

en donde el grupo asociativo y el grupo activador se enlazan, los dos, por separado, al soporte sólido; en donde el grupo asociativo

- i) es por lo menos uno de los siguientes: (a) una especie iónica seleccionada del grupo consistente en una amina cuaternaria, una amina terciaria, una amina secundaria, una amina primaria, un ácido sulfónico, un ácido carboxílico, y combinaciones de los mismos; (b) una especie hidrófoba seleccionada del grupo consistente en un grupo fenilo, un grupo butilo, un grupo propilo, y combinaciones de los mismos, y
- ii) contiene un grupo funcional por medio del cual el grupo asociativo se une de manera covalente al soporte sólido, seleccionándose dicho grupo funcional del grupo consistente en un grupo amina, un grupo hidroxilo, un grupo sulfhidrilo, un grupo carboxilo, un grupo imina, un grupo aldehído, un grupo cetona, un grupo alqueno, un grupo alquino, un grupo azo, un grupo nitrilo, un grupo epóxido y un grupo de ácido carboxílico activado; y

en donde el grupo activador es por lo menos uno de los siguientes: (a) un cianógeno; (b) un aldehído; (c) un epóxido; (d) un ácido carboxílico activado.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una matriz cromatográfica de afinidad que comprende:

- (a) un soporte sólido;
- (b) un ligando proteico unido al soporte sólido;
- (c) un grupo activador unido al soporte sólido que interacciona de manera covalente con el ligando proteico; y
- (d) un grupo asociativo unido de manera covalente al soporte sólido, en donde el grupo asociativo interacciona de forma no covalente con el ligando proteico;

en donde el grupo asociativo y el grupo activador se enlazan, los dos, por separado, al soporte sólido; en donde el grupo asociativo

- i) es por lo menos uno de los siguientes: (a) una especie iónica seleccionada del grupo consistente en una amina cuaternaria, una amina terciaria, una amina secundaria, una amina primaria, un ácido sulfónico, un ácido carboxílico, y combinaciones de los mismos; (b) una especie hidrófoba seleccionada del grupo consistente en un grupo fenilo, un grupo butilo, un grupo propilo, y combinaciones de los mismos, y
 - ii) contiene un grupo funcional por medio del cual el grupo asociativo se une de manera covalente al soporte sólido, seleccionándose dicho grupo funcional del grupo consistente en un grupo amina, un grupo hidroxilo, un grupo sulfhidrilo, un grupo carboxilo, un grupo imina, un grupo aldehído, un grupo cetona, un grupo alqueno, un grupo alquino, un grupo azo, un grupo nitrilo, un grupo epóxido y un grupo de ácido carboxílico activado; y
- en donde el grupo activador es por lo menos uno de los siguientes: (a) un cianógeno; (b) un aldehído; (c) un epóxido; (d) un ácido carboxílico activado.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método de purificación de una molécula diana a partir de una mezcla, comprendiendo el método las etapas de:

- 1) hacer entrar en contacto la mezcla que comprende la molécula diana con la matriz cromatográfica de afinidad de acuerdo con el segundo aspecto, bajo un conjunto de condiciones de pH y/o salinidad que materializan la unión de ligando proteico a la molécula diana; y
- 2) modificar el conjunto de condiciones de pH y/o salinidad de 1), de tal manera que la molécula diana ya no se une al ligando proteico de la matriz, purificando así la sustancia de interés. Opcionalmente, entre las etapas 1 y 2 se pueden llevar a cabo una o más etapas de lavado que utilizan un reactivo de lavado adecuado, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, agua, o un tampón suplementado que se describe posteriormente. La matriz también se puede equilibrar con un tampón apropiado antes de la etapa 1.

En algunas realizaciones, el ligando proteico se une, por ejemplo, de manera covalente, al soporte sólido por medio de un grupo funcional activado, sin ninguna molécula enlazadora interpuesta. El ligando proteico también puede interaccionar de manera no covalente con uno o más grupos asociativos, que se unen de manera covalente, por medio de un enlace covalente diferenciado, al soporte sólido con o sin ninguna molécula enlazadora interpuesta. De este modo, en ciertas realizaciones, un grupo asociativo se acopla a un soporte sólido el cual no está asistido por ningún enlazador. En ciertas realizaciones, un ligando proteico se acopla a un soporte sólido el cual no está asistido por ningún enlazador. En ciertas realizaciones, el grupo asociativo y el ligando proteico se acoplan, cada uno de ellos, por separado, por medio de un enlace covalente, al soporte sólido.

En otras realizaciones, el ligando proteico se une, por ejemplo, de manera covalente, al soporte sólido, por medio de un grupo funcional activado, con una molécula enlazadora interpuesta. El ligando proteico también puede interaccionar de manera no covalente con uno o más grupos asociativos, los cuales se unen de forma covalente al soporte sólido sin ninguna molécula enlazadora interpuesta. De este modo, en ciertas realizaciones, un grupo asociativo se acopla a un soporte sólido el cual no está asistido por ningún enlazador y un ligando proteico se acopla a un soporte sólido el cual está asistido por enlazador.

En otras realizaciones, un grupo asociativo se acopla a un soporte sólido y un ligando proteico se acopla a un soporte sólido, donde cierta población parcial del grupo asociativo y del ligando proteico se acopla al soporte sólido por medio de un enlazador. Cierta población del ligando proteico se puede acoplar al soporte sólido por medio de un enlazador, o cierta población del grupo asociativo se puede acoplar al soporte sólido por medio de un enlazador. En algunas realizaciones, tanto el grupo asociativo como el ligando proteico tendrán poblaciones que se acoplan al soporte sólido por medio de enlazadores diferentes.

Todavía en otras realizaciones, un grupo asociativo asistido por enlazador se acopla a un soporte sólido, por ejemplo, mediante un enlace covalente. El grupo asociativo puede interaccionar, por ejemplo, de manera no covalente, con un ligando proteico acoplado de forma covalente a un soporte sólido sin ninguna molécula enlazadora interpuesta.

Debe entenderse que tanto la anterior descripción general como la siguiente descripción detallada son únicamente ejemplificativas y explicativas, y no limitan la invención, la cual queda definida por las reivindicaciones.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una gráfica que muestra las capacidades dinámica y estática de varios medios de cromatografía de afinidad que comprenden proteína A.

La Figura 2 es una gráfica que compara las capacidades de unión de varios medios cromatográficos acoplados con métodos de acoplamiento de Proteína A asistidos con y sin ligando y grupo asociativo.

10 La Figura 3 es una gráfica que muestra los niveles medidos de proteína de Células CHO (CHOP) en el material eluido, y muestra también la unión de proteína de célula huésped a medios con diferentes cantidades de grupo asociativo, con y sin un lavado intermedio con tampón salino. Todas las recuperaciones de IgG fueron similares, ~90-95%.

15 La Figura 4a es una gráfica que muestra la reducción de niveles de proteína de célula huésped en el material eluido, a partir de un medio de proteína A realizado mediante química de acoplamiento asistido por ligando llevando a cabo un lavado salino intermedio.

La Figura 4b es una gráfica que muestra la reducción de niveles de ADN en el material eluido, a partir de un medio de proteína A realizado mediante química de acoplamiento asistido por ligando llevando a cabo un lavado salino intermedio.

20 La Figura 5 es una gráfica que muestra la reducción de niveles de proteína de célula huésped en el material eluido, a partir de un medio de proteína A realizado mediante química de acoplamiento asistido por ligando llevando a cabo un lavado intermedio con el uso de un tampón con diferente concentración de pH y salina.

La Figura 6a es una gráfica que muestra la reducción de los niveles de proteína de célula huésped en el material eluido, a partir de un medio de proteína A realizado mediante química de acoplamiento asistido por ligando llevando a cabo un lavado intermedio con el uso de un tampón que contiene alanina o betaína.

25 La Figura 6b es una gráfica que muestra la reducción de niveles de proteína de célula huésped en el material eluido, a partir de un medio de proteína A realizado mediante química de acoplamiento asistido por ligando llevando a cabo un lavado intermedio con el uso de un tampón que contiene diversos aminoácidos.

30 DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES

Métodos de acoplamiento de ligandos a un soporte sólido

La invención proporciona un método de acoplamiento de un ligando proteico (por ejemplo, acoplamiento asistido por ligando), a un soporte sólido preformado, tal como un medio cromatográfico, en donde el agente activador y el grupo asociativo se enlazan, los dos, al soporte sólido mediante una reacción independiente y diferenciada, y, en donde el agente activador y el grupo asociativo no se enlazan antes de las reacciones que los enlazan de forma covalente al soporte sólido. El método comprende a) hacer reaccionar un grupo asociativo con un soporte sólido b) activar el soporte sólido, y c) acoplar un ligando proteico al soporte sólido. En ciertas realizaciones, tanto el grupo asociativo como el ligando proteico se enlazan de forma covalente al soporte sólido, pero no se enlazan covalentemente entre sí, excepto a través del soporte sólido. Tanto el grupo asociativo como el agente activador se pueden unir de forma covalente a la superficie exterior del soporte sólido. El ligando proteico se puede unir de forma covalente al agente activador, el cual se une al soporte sólido. El grupo asociativo interacciona de forma no covalente con el ligando proteico, facilitando así la formación del enlace covalente entre el ligando proteico y el agente activador que se une de forma covalente a la superficie exterior del soporte sólido. Se contempla también que tanto el ligando proteico como el grupo asociativo puedan unir poros y superficies interiores accesibles de un soporte sólido.

Se apreciará que las etapas a) y b) se pueden llevar a cabo en cualquier orden. De este modo, en algunas realizaciones, la invención proporciona una reacción de dos etapas que se puede usar para acoplar un grupo asociativo y un ligando proteico a un soporte sólido. La ejecución independiente de las etapas a) a c) proporciona una serie de ventajas, que incluyen flexibilidad en la elección de grupos asociativos, ligandos proteicos y soportes sólidos, y control sobre la relación del grupo asociativo con respecto al ligando proteico para posibilitar la optimización de condiciones con el fin de llevar a cabo la cromatografía de afinidad deseada. Esto se sitúa en contraposición con métodos descritos previamente para acoplar ligandos proteicos a soportes sólidos, por ejemplo, acoplamiento asistido por enlazador, el cual da como resultado necesariamente una relación de 1:1 del ligando proteico y el grupo asociativo.

En métodos descritos previamente, el agente activador y el grupo asociativo o bien se enlazan de forma covalente entre sí antes de unirse al soporte sólido o bien se incorporan directamente a un soporte sólido como parte de la reacción de polimerización que forma el soporte sólido. Estos métodos ofrecen poca flexibilidad y un control sub-óptimo sobre la densidad del ligando. Otros métodos descritos previamente, tales como el acoplamiento aleatorio o la fijación de múltiples puntos, se basan en cualquier grupo amina disponible en un ligando proteico. La fijación de múltiples puntos ofrece poca flexibilidad o control sobre el acoplamiento de ligandos proteicos a un soporte sólido.

Ventajas adicionales de acuerdo con la invención incluyen el uso de dos o más grupos asociativos diferentes y/o el uso de dos o más ligandos proteicos diferentes. Todavía otras de las ventajas incluyen la capacidad de controlar de

manera ajustada la densidad de ligando para optimizar la capacidad dinámica, la capacidad estática o ambas. Todavía otras ventajas proporcionan la limitación de la cantidad de unión no específica de contaminantes no deseados en la matriz. La unión no específica es un problema particular de los métodos previamente descritos que se basan en el recubrimiento del soporte sólido con una especie, tal como una especie contenedora de amina, capaz de unir un ligando proteico deseable. El control de la densidad del ligando que proporciona la invención evita el elevado nivel de unión no específica que se encuentra en estos métodos previamente descritos.

Así, desacoplando las reacciones para la unión del grupo asociativo y del agente activador al soporte sólido, la presente invención proporciona un mejor control de las relaciones de concentración tanto del agente activador como del grupo asociativo, proporcionando así un control y una personalización mejores de las condiciones cromatográficas, por ejemplo, pH, concentración salina en el tampón, para aislar la proteína diana. De este modo, en ciertas realizaciones, la invención contempla una variedad de relaciones de ligando proteico y grupos asociativos, incluyendo relaciones en las que la concentración del ligando proteico supera al grupo asociativo, y relaciones en las que la concentración del grupo asociativo supera la concentración del ligando proteico. Se contempla que, en diversas realizaciones de la invención, puede usarse una pluralidad de diferentes grupos asociativos. Se contempla también que se pueda utilizar una pluralidad de diferentes agentes activadores para activar el soporte sólido en diversas realizaciones de la invención. De manera similar, se contempla que se pueda utilizar una pluralidad de diferentes ligandos proteicos en diversas realizaciones de la invención.

Ligando proteico, tal como se usa en la presente, se refiere a una proteína que se une a un soporte sólido y que es adecuada para unirse específicamente a una molécula diana de interés. Una proteína puede incluir una proteína de longitud completa, un fragmento o subunidad de la proteína de longitud completa, un polipéptido, o un fragmento peptídico de una proteína.

En algunas realizaciones, el método de la invención proporciona el acoplamiento de ligandos proteicos de alta densidad a un soporte sólido. Esto, a su vez, puede potenciar la capacidad de unión, por ejemplo, la capacidad estática (Q_s) y la capacidad dinámica (Q_d), de la molécula diana en comparación con métodos descritos previamente. Como ejemplo, usando métodos descritos previamente, se pueden cargar, de manera típica, entre 4 y 6 mg de n-proteína A (es decir, proteína A obtenida a partir de *Staphylococcus A*) por ml de soporte sólido. Usando el método de la invención, se pueden cargar entre 7 y 100 mg de proteína A por ml de soporte sólido. En ciertas realizaciones, en un soporte sólido se pueden cargar más de 10 mg/ml de proteína A. En otras realizaciones, en un soporte sólido se pueden cargar por lo menos 8 mg/ml. En algunas realizaciones de la invención, se logra la potenciación de las capacidades estáticas y dinámicas sin modificar de forma recombinante la proteína A, por ejemplo, mediante la adición de un residuo de cisteína, ni basándose en un acoplamiento asistido por enlazador.

El método de la invención comprende hacer entrar en contacto el soporte sólido con por lo menos un grupo asociativo que es capaz de reaccionar con el soporte sólido. El soporte sólido ya puede estar formado, por ejemplo, un soporte polimerizado, el cual se hace reaccionar con al menos un grupo asociativo. En otras realizaciones, el soporte sólido puede no estar preformado, por ejemplo, no polimerizado, de tal manera que el grupo asociativo se adiciona a componentes químicos que posteriormente se hacen reaccionar para formar un soporte sólido con un grupo asociativo incorporado. La reacción entre el soporte sólido y el grupo asociativo da como resultado la formación de un enlace covalente entre el soporte sólido y el grupo asociativo. Así, el grupo asociativo se puede unir de forma covalente a la superficie exterior del soporte sólido, y también se puede unir a superficies interiores accesibles, por ejemplo, poros.

Se contemplan también interacciones no covalentes que implican el grupo asociativo, tales como interacciones iónicas, interacciones hidrófobas, fuerzas de van der Waals y enlaces de hidrógeno. Como ejemplo, el grupo asociativo puede interaccionar de manera no covalente con una molécula cargada, por ejemplo, un polímero que está fijado de forma covalente al soporte sólido. El grupo asociativo interacciona también de manera no covalente con el ligando proteico. De este modo, el soporte sólido se puede activar de tal manera que el ligando proteico se une de forma covalente al soporte sólido e interacciona de manera no covalente con el grupo asociativo. La interacción no covalente facilita la unión covalente del ligando proteico al soporte sólido.

En algunas realizaciones, el grupo asociativo reacciona directamente con el soporte sólido sin necesidad de ninguna molécula interpuesta o de enlace. En otras realizaciones, el grupo asociativo se puede proporcionar como una mezcla en la que una primera población del grupo asociativo reacciona con el soporte sólido directamente, y una segunda población del grupo asociativo reacciona con el soporte sólido indirectamente a través de una o más moléculas enlazadoras. Además, el grupo asociativo se puede modificar por activación con una molécula enlazadora incorporando así al menos parte del grupo asociativo a la molécula enlazadora, aunque permitiendo también que parte del grupo asociativo reaccione directamente, por ejemplo, se una de forma covalente, al soporte sólido. Debido a la naturaleza de ciertas reacciones químicas, el grupo asociativo diseñado para interaccionar de manera no covalente con el ligando proteico puede reaccionar con el grupo activador, acoplado así finalmente el ligando proteico al soporte sólido a través de un brazo enlazador que contiene tanto el grupo asociativo como el grupo activador. No obstante, estas reacciones de activación modifican tanto el soporte sólido como el grupo asociativo, creando una distribución de sitios de acoplamiento de proteína. Una población de estos sitios comprende un grupo

5 activado enlazado al soporte sólido a través del grupo asociativo (tal como sería el caso de una amina secundaria activada con CNBr). Puede existir una segunda población en la que los sitios de acoplamiento estén compuestos por un grupo activado, fijado directamente a la matriz de base y grupos asociativos no modificados (tal como sería el caso de una matriz de base activada con CNBr con aminas secundarias no modificadas residuales). Este es un ejemplo de las diferencias entre “acoplamiento asistido por enlazador” (en el que solamente puede existir una población de sitios de acoplamiento) y “acoplamiento asistido por ligando” (en el que pueden existir por lo menos dos poblaciones variables de sitios de acoplamiento). Puede utilizarse una gama más amplia de condiciones y configuraciones de acoplamiento, ya que el grupo asociativo y el grupo activador se pueden variar de manera independiente en cuanto al tipo, la cantidad y la reactividad de los grupos implicados.

10 Se contemplan todas las interacciones no covalentes entre el grupo asociativo y el ligando proteico. La interacción no covalente con el ligando proteico puede incluir, por ejemplo, una interacción iónica, una interacción hidrófoba, una interacción mediada por enlaces de hidrógeno o fuerzas de van der Waals.

15 En una realización, la interacción entre el grupo asociativo y el ligando proteico es iónica. Como ejemplo, un grupo asociativo cargado positivamente se puede unir al soporte sólido. A continuación, el soporte sólido se puede activar con una funcionalidad química que facilitará la unión química, por ejemplo, unión covalente, del ligando proteico al soporte sólido. El pH de la solución que contiene el ligando proteico se puede ajustar de tal manera que la proteína sea portadora de una carga complementaria con respecto a la carga del grupo asociativo asociado al soporte sólido, por ejemplo, al menos una carga negativa o una carga negativa neta. La interacción entre el grupo asociativo cargado positivamente, unido al soporte sólido, y la proteína cargada negativamente, facilitará la unión del ligando proteico al soporte sólido activado y, por lo tanto, proporcionará una mejor de la capacidad de unión en comparación con métodos descritos previamente. La especie cargada puede ser un ion, o una molécula con una carga neta.

25 La selección de las condiciones apropiadas del tampón para acoplar un ligando proteico a un soporte sólido queda claramente encuadrada dentro de las capacidades de los profesionales versados. Los tampones adecuados incluyen cualquier tampón que no contenga aminas, tal como tampones carbonato, bicarbonato, fosfato y acetato. La concentración salina del tampón dependerá del grupo asociativo que se use. Como ejemplo, la concentración salina puede estar en el intervalo de 5 nm a 100 nm. Cuando se use una especie cargada, la concentración salina puede ser al menos 5 nm aunque inferior a 0,1 M, al menos 5 nm aunque inferior a 0,01 M, al menos 5 nM aunque inferior a 0,001 M. En ciertas realizaciones, la concentración salina puede ser 0,01 M. Cuando se use una especie hidrófoba, puede que resulte deseable una alta concentración salina. De este modo, la concentración salina puede ser superior a 0,001 M, superior a 0,01 M, superior a 0,1 M.

35 El método de la invención se puede llevar a cabo a una temperatura en el intervalo de 0° C a 99° C. En ciertas realizaciones, el método se puede poner en práctica a una temperatura inferior a 60° C, inferior a 40° C, inferior a 20° C, inferior a 10° C. En algunas realizaciones, el método de la invención se puede poner en práctica a una temperatura de 4° C. En otras realizaciones, el método de la invención se puede poner en práctica a una temperatura de 20° C.

40 Grupos asociativos

Los grupos asociativos adecuados para su uso en la invención incluyen especies iónicas y especies hidrófobas. El grupo asociativo puede modificar el soporte sólido, por ejemplo, uniéndose de manera covalente directamente con el soporte sólido. En la presente, la especie iónica se selecciona del grupo consistente en aminas cuaternarias, aminas terciarias, aminas secundarias, aminas primarias, ácido sulfónico, ácido carboxílico y cualquier combinación de los mismos, mientras que la especie hidrófoba se selecciona del grupo consistente en un grupo fenilo, un grupo butilo, un grupo propilo, y cualquier combinación de los mismos. Se contempla también que se pueda utilizar una especie en modo mixto, por ejemplo, una mezcla de especies iónicas e hidrófobas. El grupo asociativo interactúa de manera no covalente con el ligando proteico. De este modo, la interacción entre el grupo asociativo y el ligando proteico puede comprender una mezcla de interacciones, por ejemplo, especies iónicas y hidrófobas.

55 El grupo asociativo se acopla covalentemente al soporte sólido mediante reacción de un grupo funcional en el soporte sólido con un grupo funcional en el grupo asociativo. De acuerdo con la invención, los grupos funcionales se seleccionan del grupo consistente en aminas, hidroxilo, sulfhidrilo, carboxilo, imina, aldehído, cetona, alqueno, alquino, azo, nitrilo, epóxido, cianógenos y grupos de ácido carboxílico activados. Como ejemplo, perlas de agarosa que contengan grupos hidroxilo que se pueden hacer reaccionar con la funcionalidad epóxido de un grupo asociativo cargado positivamente, tal como cloruro de glicidil trimetilamonio. Un profesional versado apreciará que una pluralidad de grupos asociativos se puede acoplar al soporte sólido siempre que se utilice al menos un grupo asociativo bifuncional. De este modo, grupos asociativos se pueden acoplar en tándem al soporte sólido o se pueden acoplar de manera individual directamente al soporte sólido.

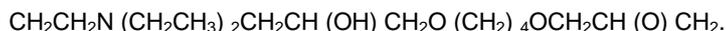
60 Ligandos proteicos y moléculas diana

65 Al llevar a la práctica la invención se puede usar cualquier ligando proteico, siempre que el mismo sea un compañero de unión específico, de una molécula diana de interés. Los ejemplos de ligandos proteicos pueden incluir Proteína A, Proteína G, el receptor Fc de un anticuerpo, un receptor para una hormona o factor de crecimiento. El

- ligando proteico puede ser una inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE o un fragmento de la misma. Los fragmentos pueden incluir fragmentos de inmunoglobulina que retienen la capacidad de unirse al epítipo antigénico diana, y/o de unirse a un receptor Fc y/o Proteína A y/o Proteína G. El ligando proteico puede ser una molécula de Fc o un fragmento de la misma; un Fab o similar; una enzima, por ejemplo, glutatión transferasa, una
- 5 tirosina quinasa, por ejemplo, MAP, Src, Lck; un sustrato, por ejemplo, glutatión. El ligando proteico puede ser un marcador proteico, tal como un polipéptido que comprenda una o más histidinas. El ligando proteico puede ser una proteína de fusión, tal como Embrel®. El ligando proteico puede ser una proteína de unión a ácido nucleico, tal como un factor de transcripción, transcriptasa inversa, topo-isomerasa, helicasa. Si la molécula diana es un receptor, su
- 10 ligando, por ejemplo, el factor de crecimiento, puede actuar como ligando proteico en el método de esta invención. Cuando la molécula diana es una inmunoglobulina, por ejemplo, IgG o un fragmento de la misma que contiene por lo menos una parte de una región Fc, el ligando proteico puede ser Proteína A, Proteína G o un fragmento funcional de las mismas. Un fragmento funcional de las mismas puede incluir un fragmento de Proteína A o un fragmento de Proteína G, que conserve la capacidad de unirse a una región Fc, o fragmento Fc, de una IgG.
- 15 El ligando proteico puede ser una molécula de origen natural o una molécula modificada. En ciertas realizaciones, puede que sea deseable modificar genéticamente ligandos proteicos de origen natural para facilitar o bien la unión a un soporte sólido o bien la orientación del ligando proteico en el soporte sólido o ambas opciones. De este modo, en función del grupo asociativo usado, el profesional versado puede modificar grupos cargados o grupos hidrófobos, o
- 20 ambos, obteniendo ligando proteico. Estos cambios se pueden realizar en cualquier lugar dentro del ligando proteico.
- Cuando el ligando proteico es la proteína A, la invención proporciona una capacidad de unión estática Qs superior a 50 mg/ml si se usa la n-proteína A (de origen natural) y superior a 65 mg/l si se usa la r-proteína A (proteína A recombinante). La proteína A recombinante puede incluir modificaciones diferentes a una cisteína terminal.
- 25 Cuando el soporte sólido se proporciona en solución, por ejemplo, una perla, una concentración adecuada de ligando proteico puede estar en el intervalo de 0,05 a 700 micromoles/ml de soporte sólido, entre 0,1 y 100 micromoles/m de soporte sólido.
- 30 Las moléculas diana pueden incluir cualquier molécula que se una específicamente al ligando proteico que se elija. Cuando el ligando proteico es proteína A o proteína G, la molécula diana puede incluir una inmunoglobulina de la subclase IgG. Un ejemplo específico de una molécula diana incluiría un anticuerpo monoclonal. Se contemplan también fragmentos de inmunoglobulinas, siempre que los mismos conserven su capacidad de unirse al ligando proteico que se elija. La molécula diana también puede ser una proteína de fusión que incluya una proteína de fusión
- 35 de Fc, tal como Embrel®.
- Soportes sólidos y agentes activadores**
- Como soporte sólido puede usarse cualquier material poroso. Como ejemplo, aunque no de manera limitativa, el material poroso puede adoptar la forma de una membrana, una perla, un gel, una casete, una columna, un chip, una
- 40 lámina, una placa o un monolito.
- El material poroso puede comprender una molécula orgánica o inorgánica o una combinación de moléculas orgánicas e inorgánicas, y puede comprender uno o más grupos funcionales, por ejemplo, un grupo hidroxilo, adecuado para reaccionar, por ejemplo, formar enlaces covalentes, con o bien el grupo asociativo, o bien el agente
- 45 activador o con ambos. El material poroso puede comprender un compuesto hidrófilo, un compuesto hidrófobo, un compuesto oleófilo, un compuesto oleófilo o cualquier combinación de los mismos. El material poroso puede comprender un polímero o un copolímero.
- Los ejemplos de materiales porosos adecuados, incluyen, aunque sin carácter limitativo, poliéter sulfona, poliamida, por ejemplo, agarosa, celulosa, un polisacárido, politetrafluoroetileno, polisulfona, poliéster, poli(fluoruro de
- 50 vinilideno), polipropileno, un fluorocarbono, por ejemplo, poli(tetrafluoroetileno-co-perfluoro(alquil vinil éter)), policarbonato, polietileno, vidrio, poliacrilato, poliacrilamida, poli(azolactona), poliestireno, cerámica, nailon y metal.
- Según la invención, el soporte sólido se activa con una funcionalidad química seleccionada del grupo consistente en cianógenos, por ejemplo, bromuro de cianógeno, aldehído, epóxido, ácido carboxílico activado, por ejemplo, ésteres
- 55 de N-hidroxisuccinimida, y cualquier combinación de los mismos. Cuando el grupo asociativo es una amina primaria, secundaria o terciaria, el grupo asociativo se puede activar con epíclorhidrina o un epóxido difuncional.
- Enlazadores**
- 60 En algunas realizaciones, la invención proporciona grupos asociativos y/o ligandos proteicos que se pueden acoplar a un soporte sólido por medio de un enlazador interpuesto. El enlazador puede comprender por lo menos un grupo funcional acoplado a una fracción enlazadora. La fracción de enlace puede comprender cualquier molécula capaz de acoplarse a un grupo funcional. De este modo, la fracción enlazadora puede incluir cualquier grupo alquilo, alquenilo o alquinilo. La fracción de enlace puede comprender una cadena de carbonos que va de 1 a 30 átomos de carbono.
- 65 En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender más de 30 átomos de carbono. La fracción enlazadora

puede comprender por lo menos un heteroátomo, tal como nitrógeno, oxígeno y azufre. La fracción enlazadora puede comprender una cadena ramificada, una cadena no ramificada o una cadena cíclica. La fracción enlazadora se puede sustituir con dos o más grupos funcionales. En una realización específica, el enlazador puede comprender lo siguiente fijado a través de un grupo hidroxilo a agarosa:

5



Métodos de purificación de una molécula diana

10

En un aspecto, la invención proporciona un método de purificación de una molécula diana a partir de una mezcla. La molécula diana puede ser cualquier molécula con un compañero de unión específico, siempre que el compañero de unión específico se pueda acoplar a un soporte sólido. Los ejemplos de moléculas diana pueden incluir proteínas, tales como inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas pueden ser anticuerpos policlonales o un anticuerpo monoclonal o un fragmento funcional de los mismos. Los fragmentos funcionales pueden incluir cualquier fragmento de una inmunoglobulina que comprenda una región variable que siga uniéndose específicamente a su antígeno, aunque, al mismo tiempo, conservando su capacidad de unirse específicamente a un ligando proteico acoplado a un soporte sólido.

15

20

25

30

En ciertas realizaciones, el método comprende a) hacer entrar en contacto una mezcla que comprende una molécula diana con una matriz cromatográfica de afinidad según se describe en la presente, bajo un conjunto de condiciones de pH y/o salinidad que materializan la unión del ligando proteico a la molécula diana, y b) modificar el conjunto de condiciones de pH y/o salinidad, de tal manera que la molécula diana ya no se une al ligando proteico de la matriz. En ciertas realizaciones, el método comprende modificar el pH entre la etapa a) y la etapa b). En algunas realizaciones, la etapa b) se puede llevar a cabo con un pH que sea más ácido que el pH de la etapa a). En ciertas realizaciones, la etapa b) comprende modificar el pH. Así, la etapa a) se puede llevar a cabo con un pH neutro, o un pH en el intervalo de 6 a 8, y la etapa b) se puede llevar a cabo con un pH ácido, por ejemplo, un pH en el intervalo de 1 a 6. En otras realizaciones, el método comprende modificar la concentración salina del tampón. De este modo, en una realización, en la etapa a) puede usarse una concentración salina alta, por ejemplo, > 0,1 M, y/o, en la etapa b) puede usarse una concentración salina baja, por ejemplo, < 0,1 M. En otras realizaciones, en la etapa a) puede usarse una concentración salina baja, < 0,1 M, y/o, en la etapa b), puede usarse una concentración salina alta. Todavía en otras realizaciones, el pH y/o la concentración salina del tampón se pueden modificar entre la etapa a) y la etapa b).

1. Lavado intermedio de matrices cromatográficas

35

40

En ciertas realizaciones, la matriz cromatográfica se lava para eliminar contaminantes no unidos de manera específica, y, así, obtener un producto final más puro. La matriz puede incluir cualquier matriz cromatográfica conocida en la técnica. Como ejemplo, la matriz cromatográfica puede ser una matriz de afinidad. La matriz de afinidad puede ser cualquiera de las matrices de afinidad descritas en la presente, incluyendo una matriz de afinidad que se realice por acoplamiento asistido con ligandos. El método puede incluir un lavado intermedio el cual se lleva a cabo después de que la molécula diana se haya unido a la matriz cromatográfica. Típicamente, los contaminantes no adsorbidos de manera específica, pueden incluir cualquier componente excepto el producto o molécula diana. Ejemplos de contaminantes no unidos específicamente pueden incluir proteínas, ADN, lípidos, endotoxinas, partículas virales, y otras moléculas pequeñas incluyendo rojo fenol, peptona, pluronic F68, y un aminoácido.

45

50

El reactivo de lavado intermedio puede comprender un tampón de equilibrado o un tampón que tenga un pH y una concentración salina similares a la del material aportado (es decir, la solución que contiene la muestra no purificada), y que comprende además a) una concentración elevada de sales (por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, sulfato de amonio, etcétera), o b) un pH diferente (inferior o superior), o c) combinaciones de a) y b), o d) aditivos, por ejemplo, surfactantes, (por ejemplo, Tween), aminoácidos y derivados de los mismos, o un soluto orgánico (por ejemplo, etilenglicol). El lavado intermedio puede reducir la unión no específica de ciertas especies en entre 2 y 5 veces, en comparación con soluciones de lavado tales como PBS. En algunas realizaciones, se logra una reducción de más de cinco veces de la unión no específica de ciertas especies, en comparación con soluciones de lavado conocidas, tales como PBS.

55

60

En ciertas realizaciones, la matriz de afinidad se lava para eliminar especies no unidas de manera específica, lo cual comprende hacer entrar en contacto una matriz de afinidad con un tampón que tiene un pH ligeramente básico (por ejemplo, entre 7,3 y 7,5) y con una concentración salina suplementada en el intervalo de 0 a 1 M. De este modo, el tampón puede ser PBS, o cualquier otro tampón adecuado, que se suplementa además con sal adicional. En algunas realizaciones, la concentración salina va de 0,15 M a 1 M. Todavía en otras realizaciones, la concentración salina va de 0,25 M a 1 M. Aún en otras realizaciones, la concentración salina va de 0,25 M a 0,5 M. En algunas realizaciones, la concentración salina es superior a 0,0001 M, aunque inferior a 0,8 M.

65

En otras realizaciones, el tampón, por ejemplo, PBS o cualquier otro tampón adecuado, puede tener un pH ácido (por ejemplo, 6,5), y una concentración salina suplementada que sea inferior a 1 M, aunque superior a 0,0001 M (por ejemplo, 0,4 M). Todavía en otras realizaciones, el tampón puede tener un pH ligeramente básico (por ejemplo, de 7,3 a 7,5). En algunas realizaciones, el tampón de lavado puede comprender uno o más aminoácidos cargados. El

tampón de lavado puede comprender un aminoácido o un aminoácido alquilado incluyendo betaína, L-alanina, glicina, valina, ácido glutámico, y lisina. El aminoácido o aminoácido alquilado puede estar presente en una concentración en el intervalo de 0,25 M a 0,5 M. En ciertas realizaciones, la concentración del aminoácido o aminoácido alquilado es inferior a 0,5 M, aunque superior a 0,0001 M. Todavía en otras realizaciones, la concentración del aminoácido o aminoácido alquilado puede estar en el intervalo de 0,0001 M a 1 M. Los aminoácidos adecuados que se pueden usar en un tampón de lavado intermedio incluyen, aunque sin carácter limitativo, glicina, valina, lisina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, así como derivados de aminoácido, tales como n-metil glicina, y trimetil β-alanina. En algunas realizaciones en las que el tampón de lavado intermedio comprende un tampón suplementado con un aminoácido o un derivado de aminoácido, el tampón puede tener un pH ligeramente ácido, por ejemplo, en el intervalo de 6,0 a 6,99.

Ejemplos

Ejemplo 1: acoplamiento asistido por ligandos utilizando ligandos de amina cuaternaria, bromuro de cianógeno y n-Proteína A (14/mg/ml)

Perlas de agarosa (Sefarosa 4B) (GE Healthcare, Piscataway, NJ) se reticularon usando epíclorhidrina de acuerdo con un método descrito previamente (Porath y Fornstedt, 1970, *J. Chromatography*, 51:479). Las perlas de agarosa se hicieron reaccionar con un grupo asociativo cargado positivamente, por ejemplo, cationes, de acuerdo con el siguiente método: 100 mL de perlas se adicionaron a 100 mL de cloruro de glicidil trimetilamonio (GTMAC) al 75% en peso y 3,3 g de hidróxido de sodio al 50% en peso. La reacción se agitó vigorosamente (> 100 rpm) en un agitador rotatorio durante la noche, a temperatura ambiente. A continuación, las perlas se filtraron y se lavaron con tres volúmenes de 200 mL de agua Milli-Q (Millipore Corp, Billerica, MA).

Las perlas (10 mL) se filtraron, y a continuación, se equilibraron en 20 mL de Na₂CO₃ 1 M. La muestra se enfrió en hielo junto con un segundo frasco que contenía una solución de 0,5 g de CNBr/mL de acetonitrilo. Una vez que las soluciones se enfriaron, 1,5 mL de la solución de CNBr y acetonitrilo se adicionaron a las perlas, y las perlas se colocaron en un agitador (> 100 rpm) con hielo. Dos minutos más tarde, se adicionaron otros 1,5 mL de la solución de CNBr y acetonitrilo a las perlas, y estas se colocaron nuevamente en un agitador (> 100 rpm) con hielo. Las perlas se dejaron reaccionar durante 4 minutos y, a continuación, se lavaron con 200 mL de agua helada y 200 mL de NaHCO₃ 0,012 M helado y se filtraron. La torta de perlas filtrada (10 mL) se adicionó a 10 mL de NaHCO₃ 0,012 M que contenían 140 mg de n-Proteína A (14 mg/mL). Las perlas se agitaron a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, las perlas se lavaron con NaHCO₃ 0,2 M y se filtraron. La torta de perlas se adicionó a 20 mL de etanolamina 0,5 M en NaHCO₃ 0,2 M. Después de 30 minutos, las perlas se lavaron con NaHCO₃ 0,2 M, acetato de sodio 0,1 M con NaCl 0,5 M (pH 4,5) y, a continuación, finalmente con solución salina tamponada con fosfato. Se determinó la capacidad estática y dinámica según se describe posteriormente en el Ejemplo 12.

Ejemplo 2: acoplamiento asistido con ligandos utilizando ligandos de amina cuaternaria, bromuro de cianógeno y n-Proteína A (17,8 mg/ml)

Perlas de agarosa (Sefarosa 4B) (GE Healthcare, Piscataway NJ) se reticularon utilizando epíclorhidrina de acuerdo con un método descrito previamente (Porath y Fornstedt, 1970, *J. Chromatography*, 51:479). Las perlas de agarosa se hicieron reaccionar con grupos asociativos cargados positivamente, por ejemplo, cationes, de acuerdo con el siguiente método: 100 mL de perlas se adicionaron a 100 mL de cloruro de glicidil trimetilamonio (GTMAC) al 75% en peso y 3,3 g de hidróxido de sodio al 50% en peso. La reacción se agitó vigorosamente (> 100 rpm) en un agitador rotatorio durante la noche, a temperatura ambiente. A continuación, las perlas se filtraron y se lavaron con tres volúmenes de 200 mL de agua Milli-Q (Millipore Corp, Billerica, MA).

Las perlas (10 mL) se filtraron, y a continuación, se equilibraron en 20 mL de Na₂CO₃ 1 M. La muestra se enfrió en hielo junto con un segundo frasco que contenía una solución de 0,5 g de CNBr/mL de acetonitrilo. Después de que las soluciones se enfriaran, 1,5 mL de la solución de CNBr y acetonitrilo se adicionaron a las perlas, y las perlas se colocaron en un agitador (> 100 rpm) con hielo. Dos minutos más tarde, se adicionaron otros 1,5 mL de la solución de CNBr y acetonitrilo a las perlas, y estas se colocaron en un agitador (> 100 rpm) con hielo. Las perlas se dejaron reaccionar 4 minutos y, a continuación, se lavaron con 200 mL de agua helada y 200 mL de NaHCO₃ 0,012 M helado y se filtraron. La torta de perlas filtrada (10 mL) se adicionó a 16 mL de NaHCO₃ 0,012 M que contenían 285 mg de n-Proteína A (17,8 mg/mL). Las perlas se agitaron a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, las perlas se lavaron con NaHCO₃ 0,2 M y se filtraron. La torta de perlas se adicionó a 20 mL de etanolamina 0,5 M en NaHCO₃ 0,2 M. Después de 30 minutos, las perlas se lavaron con NaHCO₃ 0,2 M, acetato de sodio 0,1 M con NaCl 0,5 M (pH 4,5) y, finalmente con solución salina tamponada con fosfato. Se determinó la capacidad estática y dinámica según se describe posteriormente en el Ejemplo 12.

Ejemplo 3: acoplamiento asistido con ligandos utilizando ligandos de amina cuaternaria, bromuro de cianógeno y n-Proteína A

Perlas de agarosa (Sefarosa 4B) (GE Healthcare, Piscataway NJ) se reticularon utilizando epíclorhidrina de acuerdo con un método descrito previamente (Porath y Fornstedt, 1970, *J. Chromatography*, 51:479). Las perlas de agarosa se hicieron reaccionar con grupos asociativos cargados positivamente, por ejemplo, cationes, de acuerdo con el siguiente método: 100 mL de perlas se adicionaron a 100 mL de cloruro de glicidil trimetilamonio (GTMAC) al 75%

en peso y 3,3 g de hidróxido de sodio al 50% en peso. La reacción se agitó vigorosamente (> 100 rpm) en un agitador rotatorio durante la noche, a temperatura ambiente. A continuación, las perlas se filtraron y se lavaron con tres volúmenes de 200 mL de agua Milli-Q.

5 Las perlas (10 mL) se filtraron, y a continuación, se equilibraron en 20 mL de Na_2CO_3 1 M. La muestra se enfrió en hielo junto con un segundo frasco que contenía una solución de 0,5 g de CNBr/mL de acetonitrilo. Después de que las soluciones se enfriaran, 1,5 mL de la solución de CNBr y acetonitrilo se adicionaron a las perlas, y las perlas se colocaron en un agitador (> 100 rpm) con hielo. Dos minutos más tarde, se adicionaron otros 1,5 mL de la solución de CNBr y acetonitrilo a las perlas, y estas se colocaron en un agitador (> 100 rpm) con hielo. Las perlas se dejaron reaccionar 4 minutos y, a continuación, se lavaron con 200 mL de agua helada y 200 mL de NaHCO_3 0,012 M helado y se filtraron. La torta de perlas filtrada (10 mL) se adicionó a 10 mL de NaHCO_3 0,012 M que contenían 250 mg de r-Proteína A (25 mg/mL) disponible comercialmente. Las perlas se agitaron a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, las perlas se lavaron con NaHCO_3 0,2 M y se filtraron. La torta de perlas se adicionó a 20 mL de etanolamina 0,5 M en NaHCO_3 0,2 M. Después de 30 minutos, las perlas se lavaron con NaHCO_3 0,2 M, acetato de sodio 0,1 M con NaCl 0,5 M (pH 4,5) y, finalmente con solución salina tamponada con fosfato. Se determinó la capacidad estática y dinámica según se describe posteriormente en el Ejemplo 12.

Ejemplo 4: acoplamiento no asistido con ligandos, sin ligandos de amina cuaternaria, utilizando bromuro de cianógeno y n-Proteína A (17,8 mg/ml) (no de acuerdo con la invención)
 20 Perlas de agarosa (Sefarosa 4B) (GE Healthcare, Piscataway, NJ) se reticularon usando epíclorhidrina de acuerdo con un método descrito previamente (Porath y Fornstedt, 1970, *J. Chromatography*, 51:479). A continuación, las perlas se filtraron y se lavaron con tres volúmenes de 200 mL de agua Milli-Q (Millipore Corp, Billerica, MA).

25 Las perlas (10 mL) se filtraron, y a continuación, se equilibraron en 20 mL de Na_2CO_3 1 M. La muestra se enfrió en hielo junto con un segundo frasco que contenía una solución de 0,5 g de CNBr/mL de acetonitrilo. Después de que las soluciones se enfriaran, 1,5 mL de la solución de CNBr y acetonitrilo se adicionaron a las perlas, y estas se colocaron en un agitador (> 100 rpm) con hielo. Dos minutos más tarde, se adicionaron otros 1,5 mL de la solución de CNBr y acetonitrilo a las perlas, y estas se colocaron en un agitador (> 100 rpm) con hielo. Las perlas se dejaron reaccionar 4 minutos y, a continuación, se lavaron con 200 mL de agua helada y 200 mL de NaHCO_3 0,012 M helado y se filtraron. La torta de perlas filtrada (10 mL) se adicionó a 16 mL de NaHCO_3 0,012 M que contenían 285 mg de n-Proteína A (17,8 mg/mL). Las perlas se agitaron a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, las perlas se lavaron con NaHCO_3 0,2 M y se filtraron. La torta de perlas se adicionó a 20 mL de etanolamina 0,5 M en NaHCO_3 0,2 M. Después de 30 minutos, las perlas se lavaron con NaHCO_3 0,2 M, acetato de sodio 0,1 M con NaCl 0,5 M (pH 4,5) y, finalmente con solución salina tamponada con fosfato. Se determinó la capacidad dinámica y estática según se describe posteriormente en el Ejemplo 12.

Ejemplo 5: acoplamiento no asistido con ligandos, sin ligandos de amina cuaternaria, utilizando bromuro de cianógeno y r-Proteína A (no de acuerdo con la invención)
 40 Perlas de agarosa (Sefarosa 4B) (GE Healthcare, Piscataway, NJ) se reticularon usando epíclorhidrina de acuerdo con un método descrito previamente (Porath y Fornstedt, 1970, *J. Chromatography*, 51:479). A continuación, las perlas se filtraron y se lavaron con tres volúmenes de 200 mL de agua Milli-Q® (Millipore Corporation, Billerica, MA). Las perlas (10 mL) se filtraron, y a continuación, se equilibraron en 20 mL de Na_2CO_3 1 M. La muestra se enfrió en hielo junto con un segundo frasco que contenía una solución de 0,5 g de CNBr/mL de acetonitrilo. Después de que las soluciones se enfriaran, 1,5 mL de la solución de CNBr y acetonitrilo se adicionaron a las perlas, y estas se colocaron en un agitador (> 100 rpm) con hielo. Dos minutos más tarde, se adicionaron otros 1,5 mL de la solución de CNBr y acetonitrilo a las perlas, y estas se colocaron en un agitador (> 100 rpm) con hielo. Las perlas se dejaron reaccionar 4 minutos y, a continuación, se lavaron con 200 mL de agua helada y 200 mL de NaHCO_3 0,012 M helado y se filtraron. La torta de perlas filtrada (10 mL) se adicionó a 10 mL de NaHCO_3 0,012 M que contenían 250 mg de r-Proteína A (25 mg/mL) disponible comercialmente. Las perlas se agitaron a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, las perlas se lavaron con NaHCO_3 0,2 M y se filtraron. La torta de perlas se adicionó a 20 mL de etanolamina 0,5 M en NaHCO_3 0,2 M. Después de 30 minutos, las perlas se lavaron con NaHCO_3 0,2 M, acetato de sodio 0,1 M con NaCl 0,5 M (pH 4,5) y, finalmente con solución salina tamponada con fosfato. Se determinó la capacidad dinámica y estática según se describe posteriormente en el Ejemplo 12.

55 Ejemplo 6: acoplamiento asistido con ligandos utilizando ligandos de amina cuaternaria, éter diglicídico de butanodiol y n-Proteína A
 Perlas de agarosa (Sefarosa 4B) (GE Healthcare, Piscataway NJ) se reticularon utilizando epíclorhidrina de acuerdo con un método descrito previamente (Porath y Fornstedt, 1970, *J. Chromatography*, 51:479). Las perlas de agarosa se hicieron reaccionar con grupos asociativos cargados positivamente, por ejemplo, cationes, de acuerdo con el siguiente método: 50 mL de perlas se adicionaron a 40 g de cloruro de glicidil trimetilamonio (GTMAC) al 75% en peso, 10 mL de agua Milli-Q y 1,67 g de hidróxido de sodio al 50% en peso. La reacción se agitó vigorosamente (> 100 rpm) en un agitador rotatorio durante la noche, a temperatura ambiente. A continuación, las perlas se filtraron y se lavaron con tres volúmenes de 100 mL de agua Milli-Q® (Millipore Corp, Billerica, MA). Una muestra de las perlas se tituló usando el protocolo descrito posteriormente, para determinar la densidad de ligando de amonio cuaternario.

65

Las perlas (50 mL, torta filtrada) se adicionaron a un frasco que contenía 15 mL de NaOH 4,6 M. Se formó una lechada de la mezcla, y, a continuación, se adicionaron 19,5 mL de éter diglicídico de butanodiol (BUDGE). Esta mezcla se agitó a 35°C durante 2 horas. A continuación, las perlas se lavaron con 750 mL de agua Milli-Q® (Millipore Corp, Billerica, MA) y se equilibraron con 250 mL de NaHCO₃ 10 mM.

5 Inmediatamente tras la etapa de activación con BUDGE, se adicionaron 10 mL de la torta de perlas filtrada a 10 mL de solución de NaHCO₃ 10 mM que contenía una concentración de 30 g/L de n-Proteína A. Las perlas se hicieron girar en un hibridador a 37°C durante 2 horas. Después de dos horas, las perlas se lavaron con 30 mL de agua Milli-Q® (Millipore Corporation, Billerica, MA). La torta de perlas filtrada (10 mL) se adicionó a un frasco que contenía una
10 solución de 10 mL compuesta por 1 mL de tioglicerol y 9 mL de una solución tampón con NaHCO₃ 0,2 M y NaCl 0,5 M. Se formó una lechada de la mezcla, y la misma se sometió a rotación durante la noche a temperatura ambiente. A continuación, las perlas se lavaron con 30 mL de los siguientes tampones: Tampón Tris 0,1 M (pH 8), Tampón Tris 0,1 M con NaCl 0,15 M (pH 8), ácido acético 50 mM (pH 4,5), PBS (pH 7,4) con azida sódica a 0,002%. A continuación, las perlas se caracterizaron en cuanto a su capacidad estática según se ha descrito y en cuanto a la
15 densidad del ligando de Proteína A usando el ensayo de BCA estándar (Pierce, Rockford, IL) con el uso de n-Proteína A para la curva estándar, véase la Tabla 1 posteriormente.

Ejemplo 7: acoplamiento asistido con ligandos usando ligandos de amina cuaternaria, éter diglicídico de butanodiol y n-Proteína A

20 Las perlas del Ejemplo 7 son idénticas a las perlas descritas en el Ejemplo 6, con la excepción de la adición de los grupos asociativos. Las perlas de agarosa se hicieron reaccionar con grupos asociativos cargados positivamente, por ejemplo, cationes, de acuerdo con el siguiente método: se adicionaron 50 mL de perlas a 25 g de GTMAC al 75% en peso, 25 mL de agua Milli-Q® y 1,67 g de hidróxido de sodio al 50% en peso. La reacción se agitó vigorosamente (> 100 rpm) en un agitador rotatorio durante la noche, a temperatura ambiente. A continuación, las perlas se filtraron y se lavaron con tres volúmenes de 100 mL de agua Milli-Q® (Millipore Corporation, Billerica, MA). La totalidad de las etapas subsiguientes (activación con BUDGE y acoplamiento de Proteína A) fueron idénticas a las descritas en el Ejemplo 6. A continuación, las perlas se caracterizaron en cuanto a capacidad estática según se ha descrito y en cuanto a densidad del ligando de Proteína A usando el ensayo de BCA estándar (Pierce, Rockford, IL) con el uso de n-Proteína A para la curva estándar, véase la Tabla 1 posteriormente.

30 Ejemplo 8: acoplamiento asistido con ligandos usando ligandos de amina cuaternaria, éter diglicídico de butanodiol y n-Proteína A

35 Las perlas del Ejemplo 8 son idénticas a las perlas descritas en el Ejemplo 6, con la excepción de la adición de los grupos asociativos. Las perlas de agarosa se hicieron reaccionar con grupos asociativos cargados positivamente, por ejemplo, cationes, de acuerdo con el siguiente método: se adicionaron 50 mL de perlas a 10 g de GTMAC al 75% en peso, 40 mL de agua Milli-Q® (Millipore Corporation, Billerica, MA) y 1,67 g de hidróxido de sodio al 50% en peso. La reacción se agitó vigorosamente (> 100 rpm) en un agitador rotatorio durante la noche, a temperatura ambiente. A continuación, las perlas se filtraron y se lavaron con tres volúmenes de 100 mL de agua Milli-Q® (Millipore Corporation, Billerica, MA). La totalidad de las etapas subsiguientes (activación con BUDGE y acoplamiento de Proteína A) fueron idénticas a las descritas en el Ejemplo 6. A continuación, las perlas se caracterizaron en cuanto a capacidad estática según se ha descrito y en cuanto a densidad del ligando de Proteína A usando el ensayo de BCA estándar (Pierce, Rockford, IL) con el uso de n-Proteína A para la curva estándar, véase la Tabla 1 posteriormente.

45 Tabla 1. Resumen de características de los medios para los Ejemplos 6 a 8

	Densidad de Ligando Asociativo (µmol/mL)	Capacidad Estática (g/L)	Densidad de Ligando de Proteína A (g/L)
Ejemplo 6	20-40	71	15
Ejemplo 7	10-20	68	14
Ejemplo 8	5-10	64	12
Q-Sepharosa FF	170-180		
Mabselect		55	9

Ejemplo 9: acoplamiento asistido con ligandos usando ligandos de amina cuaternaria, epiclorhidrina y n-Proteína A sobre CPG

50 Se usó vidrio de poro controlado (CPG) (Millipore Corporation, Billerica, MA) LCA-CPG 1000 A, para acoplar Proteína A a CPG usando un grupo asociativo. Se adicionó LCA-CPG (10 mL) a 10 mL de solución acuosa que contenía cloruro de glicidil trimetilamonio al 50% en peso. La reacción se agitó ligeramente (< 100 rpm) durante la noche a 30°C. A continuación, el CPG se lavó con 50 mL de agua Milli-Q® (Millipore Corporation, Billerica, MA) y se filtró obteniendo una torta seca. A continuación, el CPG se adicionó a 35 mL de una solución acuosa de epiclorhidrina (6% en peso) agitada ligeramente a 30° C durante 2 horas. Las perlas, a continuación, se lavaron con 100 mL de agua Milli-Q® (Millipore Corporation, Billerica, MA) y se filtraron entonces obteniendo una torta seca. Las perlas (5 mL) se adicionaron a 5 mL de NaHCO₃ 0,01 M que contenía una concentración de n-Proteína A de 15

mg/mL. La reacción de acoplamiento se agitó ligeramente durante la noche a 35° C. A continuación, las perlas se lavaron con 100 mL de agua Milli-Q® (Millipore Corporation, Billerica, MA) y, a continuación, se filtraron obteniendo una torta seca. A continuación, las perlas se adicionaron a 10 mL de etanolamina 1 M en tampón Tris 0,1 M a pH 8. La reacción se dejó avanzar durante 1 hora y, a continuación, las perlas se lavaron con 50 mL individualmente de NaHCO₃ 0,2 M, acetato de sodio 0,1 M con NaCl 0,5 M (pH 4,5) y, a continuación, finalmente con solución salina tamponada con fosfato. La capacidad estática se determinó según se ha descrito previamente, y los resultados se muestran en la Tabla 2. La concentración de los grupos asociativos se determinó mediante análisis elemental.

Ejemplo 10: acoplamiento con ligandos de n-Proteína A sin utilizar ligandos de amina cuaternaria, ni epiclorhidrina sobre CPG (no de acuerdo con la invención)

Se usó vidrio de poro controlado (CPG) (Millipore Corporation, Billerica, MA) ProSep 5-CHO 1000 A, para acoplar Proteína A a CPG sin utilizar un grupo asociativo. Las perlas de 5-CHO (5 mL) se adicionaron a 5 mL de NaHCO₃ 0,01 M que contenía una concentración de n-Proteína A de 15 mg/mL. La reacción de acoplamiento se agitó ligeramente durante la noche a 35° C. A continuación, las perlas se lavaron con 100 mL de agua Milli-Q® (Millipore Corporation, Billerica, MA) y, a continuación, se filtraron obteniendo una torta seca. Las perlas, a continuación, se adicionaron a 10 mL de etanolamina a 1 M en tampón Tris 0,1 M a un pH 8. Se dejó que la reacción avanzase durante 1 hora y, a continuación, las perlas se lavaron con 50 mL individualmente de NaHCO₃ 0,2 M, acetato sódico 0,1 M con NaCl 0,5 M (pH 4,5) y, a continuación, finalmente con solución salina tamponada con fosfato. La capacidad estática se determinó según se ha descrito previamente, y los resultados se muestran en la Tabla 2. La concentración de los grupos asociativos se determinó mediante análisis elemental.

Tabla 2. Resumen de características de los medios para los Ejemplos 9 y 10

	Densidad de Ligando Asociativo (µmol/mL)	Capacidad Estática (g/L)	Densidad de Ligando de Proteína A (g/L)
Ejemplo 9	61	65	> 10
Ejemplo 10	0	40	6

Ejemplo 11: determinación de la concentración de grupos asociativos: titulación de ligandos de amina cuaternaria. La densidad de los ligandos de amina cuaternaria se determinó usando titulación ácido-base. Una muestra de 1 mL de perlas se colocó en una columna de plástico desechable y, a continuación, se equilibró con agua Milli-Q® (10 mL) (Millipore Corp., Billerica, MA) y NaOH 1 M (10 mL). A continuación, las perlas se lavaron con 4 mL de agua Milli-Q® (Millipore Corp., Billerica, MA) y se filtraron para formar una torta de perlas húmeda. Las perlas se adicionaron a 80 mL de NaCl 1 M en un pequeño vaso de precipitados de vidrio con una barra agitadora. En el vaso de precipitados se colocó un medidor de pH. La muestra se tituló con HCl 0,01 M. Como control se usó una perla de fuerte intercambio aniónico (Q-Sefarosa FF). En la Tabla 1 posteriormente, se muestran datos correspondientes a los Ejemplos 6 a 8. Los resultados sorprendentemente demuestran que una menor densidad de los grupos asociativos y una densidad de los ligandos correspondientemente menor proporcionan una capacidad estática superior, en comparación tanto con alternativas disponibles comercialmente como con condiciones experimentales alternativas.

Ejemplo 12: determinación de la capacidad estática y dinámica de la IgG

Usando el siguiente método se determinaron la capacidad estática o de saturación para cada uno de los productos descritos en los ejemplos anteriores y para patrones de referencia:

1. Se realizaron suspensiones de perlas (20% de perlas) a partir de cada muestra en tampón de PBS.
2. Las suspensiones de perlas se agitaron y se pipetearon muestras de 500 µL a tres tubos cónicos de plástico de 15 mL.
3. Se adicionó solución de proteína (IgG) (1 mg/ml) en PBS a cada tubo (14 mL).
4. Los tubos se taparon y se agitaron lentamente (< 100 rpm) en un agitador orbital.
5. Después de 24 horas, se dejó que las perlas se asentaran y se tomó una lectura de UV de la solución después de la unión.
6. La absorbancia de UV se convirtió en concentración de IgG ($\epsilon \sim 1,38$) y se usó el balance de masas para determinar la capacidad de saturación.

Los medios de Proteína A se compactaron en columnas Omnifit (diámetro de 0,66 cm, altura del lecho de 7 cm) y se sometieron a prueba en cuanto a la capacidad de unión dinámica de inmunoglobulina humana policlonal (IgG). Las columnas se equilibraron con tampón de PBS (pH 7,4) y la proteína (1 g/L) se cargó en la columna con este mismo tampón. La capacidad en el hito del 10% se usó para comparar los diferentes medios. La Figura 1 muestra cómo se comparan las capacidades estática y dinámica para IgG para dos patrones de referencia disponibles comercialmente, Mabselect® y Mabselect Xtra® (GE, Healthcare, Piscataway, NJ) y para el producto de los Ejemplos 1 a 3. En la Figura 2 se muestran los resultados para los Ejemplos 2 a 5. La Tabla muestra la capacidad estática para los Ejemplos 6 a 8. La Tabla 2 tiene la capacidad estática de los Ejemplos 9 a 10.

Ejemplo 13: nivel de proteína de célula huésped (HCP) en material eluido de IgG para diferentes densidades del ligando asociativo con y sin lavado intermedio

Como materia prima modelo de HCP se usó un cultivo de CHO sin suero (Angel Biotechnology, Northumberland, UK) de anticuerpo monoclonal (mAb), clarificado. Después de un equilibrado con 10 volúmenes de columna (CV) de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4 a 7,5, conductividad 15 a 17 mS/cm), 20 CV de la materia portada se cargaron en una columna (diámetro interior de 0,66 cm x longitud de 7 cm) compactada con el medio de proteína A según se describe en los Ejemplos 6 a 8. A continuación, la columna se lavó con 10 CV de PBS u 8 CV de PBS (pH 7,4 a 7,5) suplementado con NaCl 1 M seguido con enjuague de 2 CV de PBS no suplementado (pH 7,4 a 7,5). A esto le siguieron 10 CV de tampón de elución de citrato de sodio 0,1 M (pH 3). La fracción de pico se recogió de 0,5 a 5,5 CV. A continuación, la columna se limpió con 5 CV de clorhidrato de guanidina 6 M y, entonces, se re-equilibró con tampón de PBS. Los experimentos de unión-elución se realizaron en un sistema de cromatografía líquida preparativa BioCad® (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). El material eluido se midió por absorbancia de UV a 280 nm, para determinar el rendimiento y la concentración de IgG. Se analizó también con respecto a la concentración de CHOP usando un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) comercial (Cygnus Technologies Inc., Southport, NC). En la Figura 3 se muestran los resultados, y estos demuestran que la unión no específica asociada a una densidad mayor del ligando de proteína se compensa fácilmente con el tampón de lavado intermedio, adecuado. Cuando se combinan con los resultados que se muestran en la Tabla 1, los datos sugieren que la flexibilidad del método y las matrices descritos en la presente, permiten que un profesional aumente al máximo la capacidad deseable aunque reduciendo al mínimo efectos colaterales no deseables, tales como la unión no específica, proporcionándose así una matriz de afinidad que se puede personalizar para una aplicación específica.

Ejemplo 14: reducción de los niveles de proteína de célula huésped (HCP) y ADN en el material eluido de IgG usando un lavado intermedio con tampón salino

Como materia prima modelo de HCP se usó un cultivo de CHO sin suero, sin expresión de IgG, clarificado (Lampire Biological Laboratories, Piperville, PA), y el mismo se enriqueció con 1 mg/ml de gamma globulina humana (hIgG) policlonal (SeraCare Life Sciences, Inc., Oceanside, CA). Después de un equilibrado con 10 volúmenes de columna (CV) de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4 a 7,5, conductividad 15 a 17 mS/cm), 20 CV de la materia portada se cargaron en una columna (diámetro interior de 0,66 cm x longitud de 7 cm) compactada con el medio de proteína A según se describe en el Ejemplo 2. A continuación, la columna se lavó con 8 CV de PBS (pH 7,4 a 7,5) suplementado con NaCl 0-1 M seguido con enjuague de 2 CV de PBS no suplementado (pH 7,4 a 7,5). A esto le siguieron 10 CV de tampón de elución de citrato de sodio 0,1 M (pH 3). La fracción de pico se recogió de 0,5 a 5,5 CV. A continuación, la columna se limpió con 5 CV de clorhidrato de guanidina 6 M y, entonces, se re-equilibró con tampón de PBS. Los experimentos de unión-elución se realizaron en un sistema de cromatografía líquida preparativa BioCad (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). El material eluido se midió por absorbancia de UV a 280 nm, para determinar el rendimiento y la concentración de IgG. Se analizó también con respecto a la concentración de CHOP usando un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) comercial (Cygnus Technologies Inc., Southport, NC).

La Figura 4a muestra los niveles de CHOP medidos en el material eluido usando diferentes tampones de lavado salinos. El aumento de la concentración de NaCl de 0 a 1 M hizo que se redujese la concentración de CHOP en más de cinco veces, desde 450 ng/ml a 80 mg/ml. Todas las recuperaciones de IgG fueron similares, ~90-95%.

La Figura 4b muestra los niveles de ADN medidos en el material eluido usando un lavado con tampón de PBS suplementado con NaCl 1 M. El lavado salino hizo que se redujesen los niveles de ADN no adsorbidos específicamente en entre un 20 y un 60%, en comparación con un lavado regular de PBS para muestras de proteína A realizadas a partir de un acoplamiento asistido con ligando.

Ejemplo 15: reducción del nivel de HCP en material eluido de IgG usando un lavado intermedio con un menor pH y una mayor concentración salina

Los experimentos se efectuaron bajo condiciones que eran similares a las descritas anteriormente en el Ejemplo 14, excepto que se usó un tampón de lavado intermedio que comprendía 8 CV de PBS (pH 6,5 y suplementado con NaCl 0,4 M).

La Figura 5 muestra los niveles de CHOP medidos en el material eluido, usando tampones de lavado intermedios con diferentes concentraciones de sal y pH. Los resultados obtenidos usando el tampón de PBS de pH 6,5 con NaCl 0,4 M redujeron el nivel de CHOP en un factor de ~ 8, en comparación con resultados obtenidos usando la etapa de lavado con tampón de PBS (pH 7,4 a 7,5) no suplementado.

Ejemplo 16: reducción del nivel de HCP en material eluido de IgG usando un lavado intermedio con tampones que contienen aminoácido o aminoácido alquilado

Los experimentos se efectuaron bajo condiciones que eran similares a las descritas en el Ejemplo 14, excepto que se usó un tampón de lavado intermedio que comprendía 8 CV de tampón de PBS (pH 7,4 a 7,5, conductividad 15 a 17 mS/cm) y betaína, L-alanina glicina, o lisina 0,25-0,5 M, o valina 0,125-0,25 M, o ácido glutámico 0,15 M.

La Figura 6a muestra los niveles medidos de CHOP en el material eluido usando tampones de lavado intermedios que contienen betaína y L-alanina. La betaína 0,25 M redujo la concentración de CHOP. En comparación, la alanina

resultó más eficaz que la betaína. Con las dos concentraciones de alanina, el CHOP unido se redujo en más de 2 veces.

5 La Figura 6b muestra los niveles medidos de CHOP en el material eluído usando tampones de lavado intermedios que contienen diversas concentraciones de valina, glicina, ácido glutámico o lisina. En comparación con el lavado de PBS, los niveles de CHOP en el material eluído fueron aproximadamente de 3 a 10 veces menores con los lavados de aminoácido, entre los cuales la lisina y el ácido glutámico parecen ser los más eficaces.

10 Todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción y otros, usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, deben interpretarse como modificados, en todos los casos, por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a no ser que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar en función de las propiedades deseadas que se busque obtener con la presente invención.

15 Las realizaciones específicas descritas en la presente se ofrecen únicamente a título de ejemplo, y no pretenden ser limitativas en modo alguno. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren únicamente como ejemplificativos, quedando indicada la invención por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Método de acoplamiento de un ligando proteico a un soporte sólido, que comprende:

- 5 a) hacer entrar en contacto el soporte sólido con un grupo asociativo tal que el grupo asociativo se une de manera covalente al soporte sólido;
 b) activar el soporte sólido usando un grupo activador; y
 c) hacer entrar en contacto el soporte sólido con el ligando proteico, tal que el ligando proteico se une al soporte sólido activado e interacciona de manera no covalente con el grupo asociativo de a);

10

en donde el grupo asociativo y el grupo activador se enlazan, los dos, por separado, al soporte sólido;
 en donde el grupo asociativo

15

i) es por lo menos uno de los siguientes: (a) una especie iónica seleccionada del grupo consistente en una amina cuaternaria, una amina terciaria, una amina secundaria, una amina primaria, un ácido sulfónico, un ácido carboxílico, y combinaciones de los mismos; (b) una especie hidrófoba seleccionada del grupo consistente en un grupo fenilo, un grupo butilo, un grupo propilo, y combinaciones de los mismos, y

20

ii) contiene un grupo funcional por medio del cual el grupo asociado se une de manera covalente al soporte sólido, seleccionándose dicho grupo funcional del grupo consistente en un grupo amina, un grupo hidroxilo, un grupo sulfhidrilo, un grupo carboxilo, un grupo imina, un grupo aldehído, un grupo cetona, un grupo alqueno, un grupo alquino, un grupo azo, un grupo nitrilo, un grupo epóxido y un grupo de ácido carboxílico activado; y

25

en donde el grupo activador es por lo menos uno de los siguientes: (a) un cianógeno; (b) un aldehído; (c) un epóxido; (d) un ácido carboxílico activado.

2. Método de la reivindicación 1, en el que el soporte sólido es una perla, preferentemente una perla de agarosa.

30

3. Método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el grupo asociativo es cloruro de glicidil trimetilamonio.

4. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el grupo activador es bromuro de cianógeno.

35

5. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ligando proteico también se puede unir a una inmunoglobulina, y preferentemente se selecciona de entre proteína A y proteína G.

6. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ligando proteico se une de manera covalente al soporte sólido.

40

7. Matriz cromatográfica de afinidad, que comprende:

45

- a) un soporte sólido;
 b) un ligando proteico unido al soporte sólido;
 c) un grupo activador unido al soporte sólido que interacciona de manera covalente con el ligando proteico; y
 d) un grupo asociativo unido de manera covalente al soporte sólido, en donde el grupo asociativo interacciona de forma no covalente con el ligando proteico;

en donde el grupo asociativo y el grupo activador se enlazan, los dos, por separado, al soporte sólido;
 en donde el grupo asociativo

50

i) es por lo menos uno de los siguientes: (a) una especie iónica seleccionada del grupo consistente en una amina cuaternaria, una amina terciaria, una amina secundaria, una amina primaria, un ácido sulfónico, un ácido carboxílico, y combinaciones de los mismos; (b) una especie hidrófoba seleccionada del grupo consistente en un grupo fenilo, un grupo butilo, un grupo propilo, y combinaciones de los mismos, y

55

ii) contiene un grupo funcional por medio del cual el grupo asociado se une de manera covalente al soporte sólido, seleccionándose dicho grupo funcional del grupo consistente en un grupo amina, un grupo hidroxilo, un grupo sulfhidrilo, un grupo carboxilo, un grupo imina, un grupo aldehído, un grupo cetona, un grupo alqueno, un grupo alquino, un grupo azo, un grupo nitrilo, un grupo epóxido y un grupo de ácido carboxílico activado; y

60

en donde el grupo activador es por lo menos uno de los siguientes: (a) un cianógeno; (b) un aldehído; (c) un epóxido; (d) un ácido carboxílico activado.

8. Matriz cromatográfica de afinidad de la reivindicación 7, en la que el soporte sólido es una perla, preferentemente una perla de agarosa.

65

9. Matriz cromatográfica de afinidad de la reivindicación 7 u 8, en la que el grupo asociativo es cloruro de glicidil trimetilamonio.
- 5 10. Matriz cromatográfica de afinidad de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que el grupo activador es bromuro de cianógeno.
11. Matriz cromatográfica de afinidad de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en la que el ligando proteico se selecciona de entre proteína A y proteína G.
- 10 12. Método de purificación de una molécula diana a partir de una mezcla, que comprende:
- (1) hacer entrar en contacto la mezcla que comprende la molécula diana con la matriz cromatográfica de afinidad de la reivindicación 7, bajo un conjunto de condiciones de pH y/o salinidad que materializan la unión de ligando proteico a la molécula diana; y
- 15 (2) modificar el conjunto de condiciones de pH y/o salinidad de (1), de tal manera que la molécula diana ya no se une al ligando proteico de la matriz, purificando así la sustancia de interés.
13. Método de la reivindicación 12, en el que la molécula diana es una inmunoglobulina o una proteína de fusión.
- 20 14. Método de la reivindicación 13, en el que la proteína de fusión es una proteína de fusión Fc.
15. Método de la reivindicación 13, en el que la inmunoglobulina es un anticuerpo monoclonal.
- 25 16. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que comprende además una etapa de lavado intermedio para eliminar contaminantes, que comprende hacer entrar en contacto el soporte de agarosa con un tampón de lavado después de la etapa 1) y antes de la etapa 2).
17. Método de la reivindicación 16, en el que los contaminantes comprenden una molécula pequeña, una proteína, un ácido nucleico o cualquier combinación de los mismos.
- 30 18. Método de la reivindicación 16, en el que el tampón de lavado comprende un pH ácido y una sal o ambos, en donde el pH preferentemente está en el intervalo de 5 a 6,99 ó de 5,0 a 8,0.
- 35 19. Método de la reivindicación 16, en el que el tampón de lavado tiene un pH básico y comprende una concentración de NaCl superior a 0,0001 M, aunque inferior a 0,8 M, en donde el pH preferentemente es 7,4.
- 40 20. Método de la reivindicación 16, en el que el tampón de lavado comprende un aminoácido o un aminoácido alquilado, en donde el aminoácido o aminoácido alquilado se selecciona preferentemente de entre L-alanina, betaína, glicina, valina, ácido glutámico y lisina.
21. Matriz cromatográfica de afinidad de la reivindicación 7 en la que a) el soporte sólido es un soporte de agarosa; b) el ligando proteico es proteína A que se une de manera covalente al soporte de agarosa; y c) al menos 10 g/L de la proteína A se une a la superficie del soporte de agarosa.
- 45 22. Matriz cromatográfica de afinidad de la reivindicación 7, en la que el soporte sólido es una perla de agarosa que comprende por lo menos 10 g/L de proteína A unida a la superficie de la perla de agarosa.
- 50 23. Método de la reivindicación 1, en el que el enlace independiente del grupo asociativo y el grupo activador comprende el desacoplamiento de las reacciones para la unión del grupo asociativo y el grupo activador al soporte sólido.

Figura 1

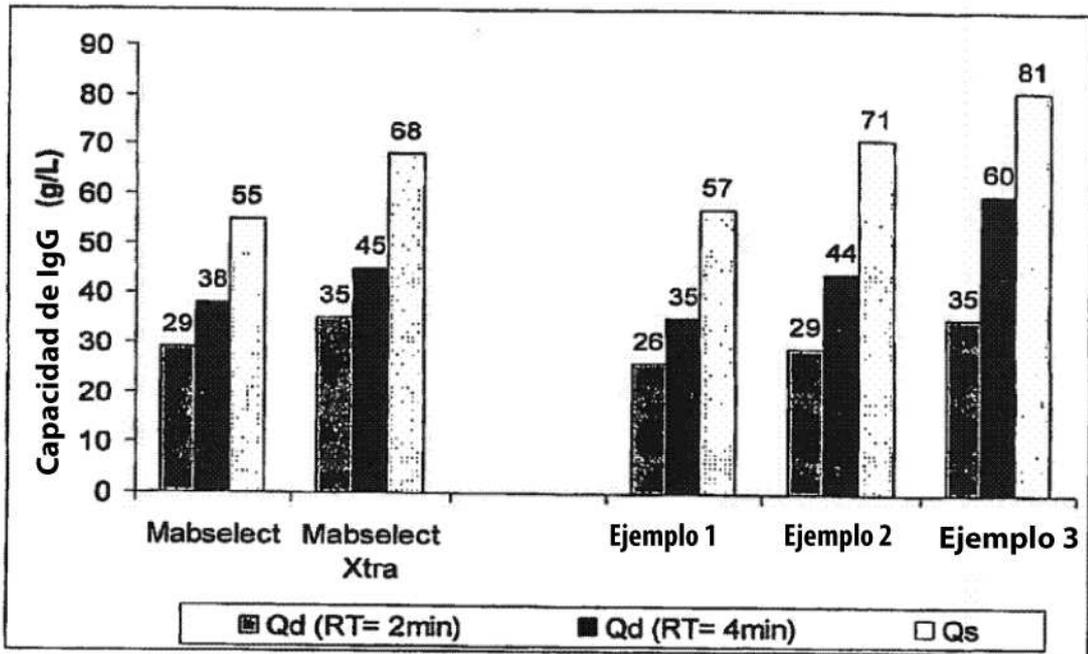


Figura 2

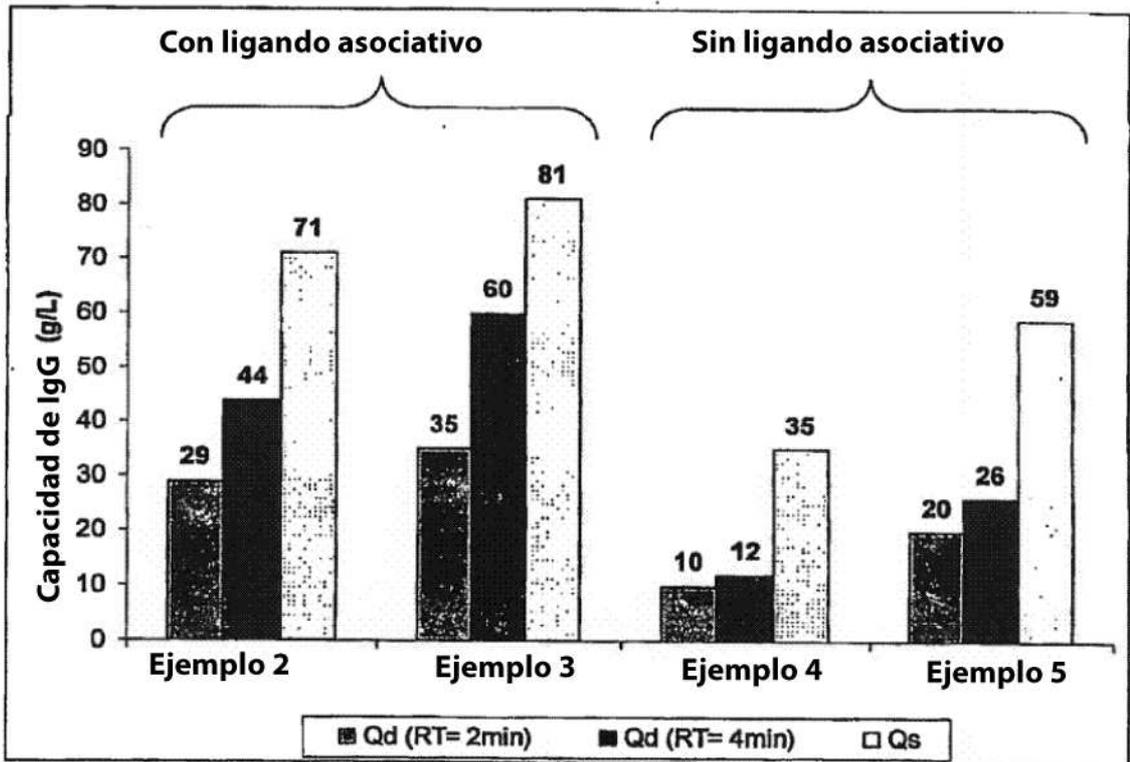


Figura 3

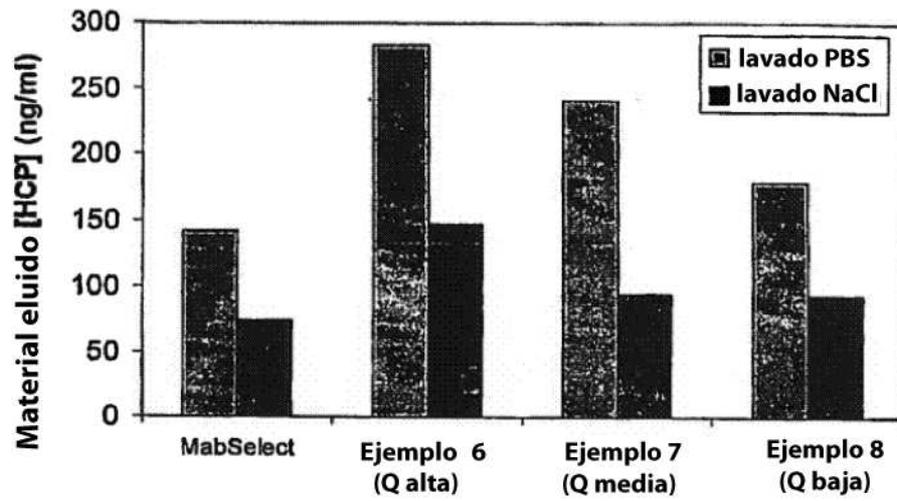


Figura 4a

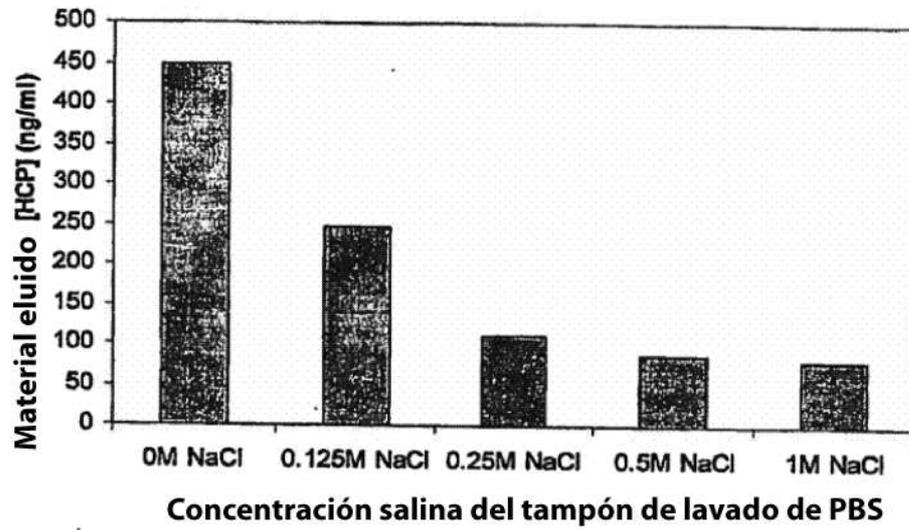


Figura 4b

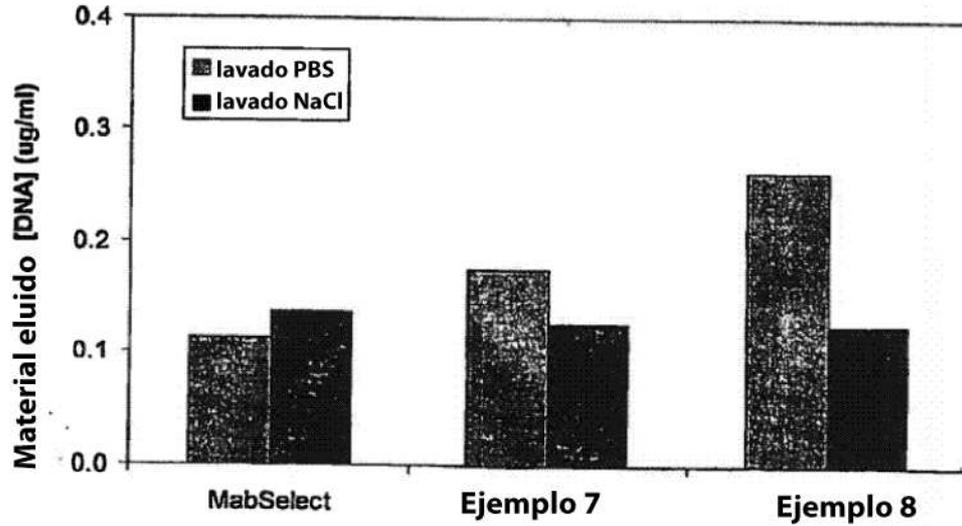


Figura 5

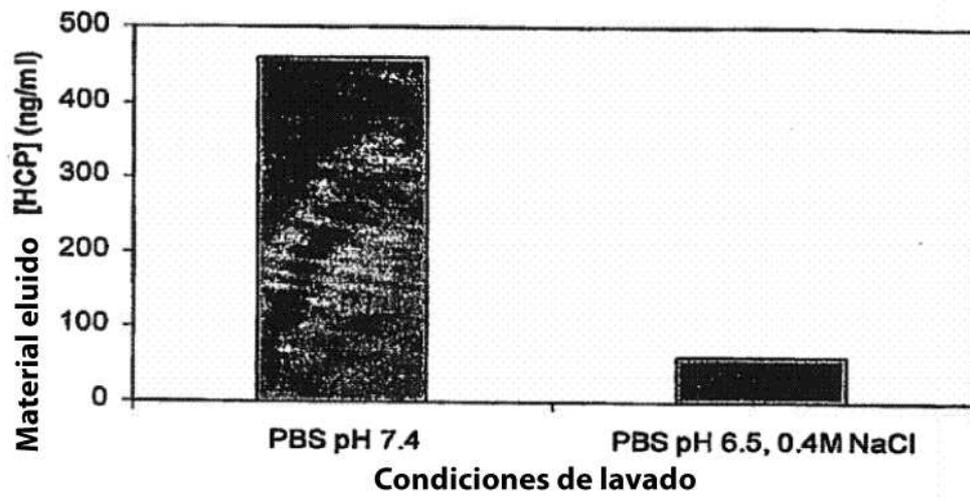


Figura 6a

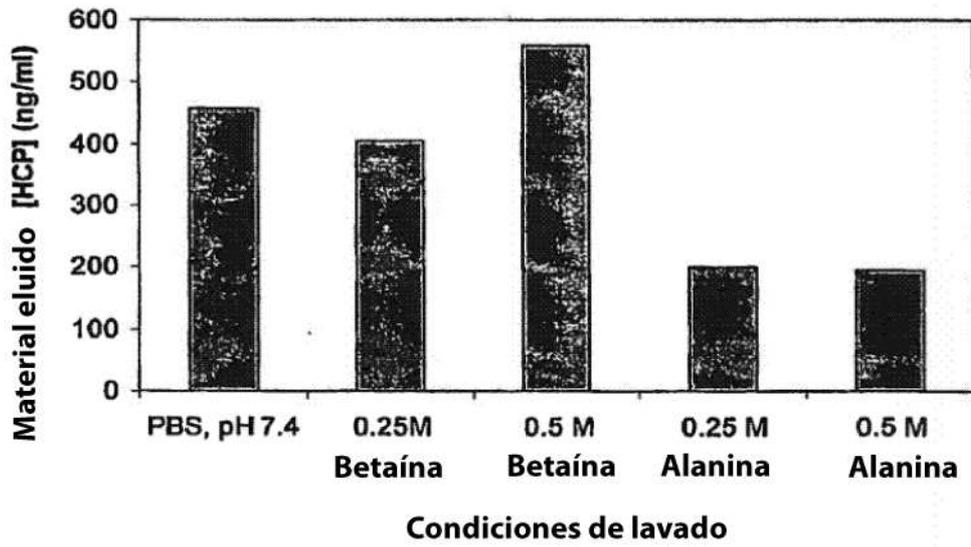


Figura 6b

