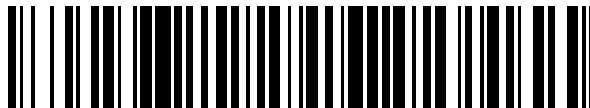


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 155**

51 Int. Cl.:

C07K 1/30 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2013 PCT/EP2013/003552**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14094957**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2013 E 13795434 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2935309**

54 Título: **Copolímeros para precipitación de proteínas**

30 Prioridad:

20.12.2012 EP 12008475

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

29.07.2019

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**BAUER, JOHANN;
RAPP, ALMUT;
STANISLAWSKI, BERND y
CAPITO, FLORIAN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 721 155 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

Copolímeros para precipitación de proteínas

La presente invención hace referencia a la purificación de moléculas diana como proteínas recombinantes y/o bioterapéuticas para la captura o clarificación a partir de un fluido de cultivo celular usando copolímeros. Los copolímeros usados de acuerdo con el proceso de la presente invención comprenden residuos hidrófobos y aniónicos.

Antecedentes de la invención

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) se usan ampliamente en aplicación clínica, sistemas de diagnóstico y diferentes campos de investigación. La producción de estas proteínas que usan sistemas de expresión celular de mamíferos ha crecido ostensiblemente desde la producción del primer mAb con licencia en 1986. Hasta la fecha, principalmente se usa tres estirpes celulares diferentes para la producción de mAb: ovario de hámster chino (CHO), mieloma murino (NSO) y células Sp2/0, mientras que la producción tiene lugar en bioreactores que varían de 5000 a 25000 litros. El procesado aguas abajo de anticuerpos y proteínas bioterapéuticas en general usa una serie de etapas de purificación, que comienzan con la recogida del fermentador, por ejemplo usando centrifugas de pila de discos, seguido de clarificación a través de sistemas de filtro de profundidad y membrana. A continuación, se usan diversas etapas cromatográficas, que comienzan con la captura inicial usando cromatografía de afinidad con Proteína A, seguido de cromatografía de intercambio aniónico y catiónico. Las etapas adicionales de cromatografía pueden implicar cromatografía de interacción hidrófila e hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño. La inactivación de virus se logra por medio de elución a pH bajo y la filtración adicional retira las partículas víricas residuales. No obstante, el aumento de los niveles de expresión de cultivo celular de 10-13 g l⁻¹ actualmente comparado con 1 g l⁻¹ hace 25 años, así como el aumento de la presión económica, requieren la necesidad de mejores métodos de purificación con rendimiento y producción elevados en comparación con el rendimiento de los actuales sistemas basados en cromatografía. Estas demandas se pueden satisfacer aumentando la capacidad del material de columna cromatográfica, las dimensiones de la columna o desarrollando medios alternativos de purificación con respecto a la cromatografía, que deberían obtener rendimientos y purezas comparables, sin embargo, con menores costes y mayor aptitud de escalado. Para grandes áreas de escala, se han desarrollado métodos de purificación por lotes, cuando se precipita la proteína deseada a partir de la disolución de células de recogida. Los métodos comunes para la precipitación de proteínas son, en este caso, precipitación de sulfato de amonio (AS) (Venkiteshwaran, Heider, et al., 2008), precipitación de polietilén glicol (PEG) o el uso de ácido caprílico como agente de precipitación (Wang, Diehl, et. al., 2009; Temponi, Kageshita, et al., 1989). No obstante, el uso de PEG o AS para la purificación a gran escala precisa grandes cantidades de estos agentes de precipitación y concentraciones elevadas de proteína, lo cual conduce únicamente a calidades de pureza moderadas, produciendo un elevada carga de residuos. Los métodos de purificación existentes son costosos, muy laboriosos con grandes volúmenes de tampón y baja producción (cromatografía) o falta de pureza y rendimiento suficientes (precipitación). La elución de mAb ligado a partir de la proteína A a pH bajo puede formar agregados inmunogénicos, de forma que la retirada de los mismos y el lixiviado de la proteína A aumenta más los costes. Por lo tanto, se requieren urgentemente medios alternativos a la cromatografía de proteína A y mejoras en cuanto a la purificación de proteínas y anticuerpos. Adicionalmente, las regiones de unión a antígeno de fragmento están ganando aceptación para aplicaciones de diagnóstico y terapia. Para obtener dichos fragmentos, se pueden usar endopeptidasas. El tratamiento de un anticuerpo monoclonal con papaína es una forma común de producir fragmentos de unión de antígeno o unión a antígeno de fragmento, que también tiene como resultado la producción de un fragmento Fc, que representa la región constante de un anticuerpo. Fab y Fc se pueden separar usando cromatografía de afinidad de proteína A, sin embargo, la técnica de separación resulta insuficiente para Fabs procedentes de mAbs que pertenecen a la subfamilia V_H3, debido a una afinidad de unión de la proteína A a este tipo de Fab. Los mAbs humanizados se basan en gran medida en secuencias génicas con abundancia de V_H3. Adicionalmente; el fago humano muestra bibliotecas que exhiben una gran presencia de V_H3. Por tanto, se precisan estrategias alternativas de separación de fragmentos de Fab y Fc. La proteína modificada A es una opción, no obstante bastante costosa.

Un enfoque muy reciente ha perseguido el uso de polímeros como agentes de precipitación que podrían aplicarse a un gran número de anticuerpos sin la demanda de adaptación.

El documento US 6.927.282 divulga el uso de polímeros aniónicos con diferentes densidades de carga para la floculación polimérica. El documento US 5.922.531 versa sobre el uso de vidrio poroso controlado tratado con capas de polielectrolito para la adsorción de proteínas. El documento WO 2008/079280 divulga el uso de polielectrolitos que son solubles en determinadas condiciones y precipitan a partir de la disolución tras un cambio en las condiciones.

El documento WO 2008/091740 divulga el uso de polímeros polianiónicos o policatiónicos para la precipitación de proteínas.

Esto muestra que el enfoque del uso de polímeros como agentes de precipitación acapara más y más interés. Existe aún el problema de encontrar un método que sea suficientemente eficiente en cuanto su idoneidad para la producción biofarmacéutica. Además, existe todavía el problema de ajustar y optimizar el procedimiento para diferentes moléculas diana.

5 Breve descripción de la invención

Se ha encontrado que los polímeros con propiedades aniónicas e hidrófobas - denominados polímeros aniónicos en modo mixto - son polímeros ideales para la precipitación de proteínas. Por medio del uso de un polímero que comprende grupos hidrófobos y aniónicos, se pueden precipitar los anticuerpos a partir de un medio de cultivo celular dando rendimientos de hasta un 90 % y más recuperación de anticuerpos con buenas purzas.

- 10 Por tanto, la presente invención va destinada a un método para aislar una molécula diana a partir de una muestra de acuerdo con la reivindicación 1.

En una realización preferida, el copolímero comprende de un 35 a un 65 % de grupos aniónicos.

En otra realización preferida, el copolímero tiene un peso molecular promedio expresado en peso entre 10.000 y 120.000 g/mol y/o polidispersidades entre 1,05-2,50.

- 15 En una realización preferida, la molécula diana es un anticuerpo.

En una realización preferida, en la etapa a) el pH de la muestra se ajusta a un valor entre 4 y 5,5.

En otra realización preferida, la fuerza iónica de la muestra se ajusta para que sea similar a una conductividad de 17 mS/cm o menos, medida a 20 °C.

En otra realización preferida, en una etapa d) adicional, el precipitado a partir de la etapa c) se re-disuelve.

- 20 En otra realización preferida, la mezcla re-disuelta de la etapa d) se trata con sílice o escamas de vidrio.

En otra realización preferida, la sílice o las escamas de vidrio se funcionalizan con grupos DMAE y/o TMAE.

Figuras

La Figura 1 muestra estructuras químicas de tipos diferentes de bloques estructurales apropiados para los copolímeros a usar en el método de la invención.

- 25 La Figura 2 muestra un espectro de infrarrojo medio como superposición espectral para comparar

a) Cetuximab de anticuerpo monoclonal que se ha tratado con técnicas de purificación de acuerdo con la presente invención

b) estructura secundaria de Cetuximab de anticuerpo monoclonal no sujeto a precipitación

y muestra que la estructura secundaria del anticuerpo no se ve alterada significativamente tras la precipitación.

- 30 La Figura 3 muestra sensogramas tras interferometría de Biocapa (BLI) de

a) anticuerpo monoclonal no precipitado

b) un anticuerpo monoclonal precipitado y re-disuelto, tratado con la técnica de purificación implicada.

- 35 que no revelan diferencia alguna en la afinidad de unión del anticuerpo precipitado y no precipitado. Las líneas rojas representan un ajuste global de los datos a un modelo de interacción 1:1. Datos recogidos usando Octet Red. Las cinéticas del anticuerpo precipitado y no precipitado se midieron en los mismos pocillos que contenía antígeno (6, 4, 3, 2 y 1 nM).

Definiciones

Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no está limitada a las composiciones o etapas del proceso específicas, ya que estas pueden variar. Debe destacarse que, tal y como se

usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, la forma en singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen referentes plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un ligando" incluye una pluralidad de ligandos y la referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de anticuerpos y similares.

- 5 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que se refiere esta invención. Los siguientes términos se definen con fines de la invención como se describe en la presente memoria.

10 Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "molécula diana" hace referencia a cualquier molécula, sustancia o compuestos que se aísla, separa o purifica a partir de uno o más componentes, por ejemplo impurezas, en una muestra. Los ejemplos de moléculas diana son anticuerpos, unión de antígeno de fragmento (Fab), región constante de fragmento (Fc), proteínas, péptidos, proteínas recombinantes, otros compuestos naturales, otros compuestos biofarmacéuticos, vacunas o agregados de compuestos biofarmacéuticos. En una realización preferida, la molécula diana es una biomolécula, preferentemente una proteína. En una realización muy preferida, la molécula diana es un anticuerpo. Típicamente, la molécula diana es el producto que se aísla por medio de la aplicación del método de la presente invención, pero también es posible usar el método de la invención para precipitar una molécula diana que no sea el producto objeto de aislamiento. En este caso, la molécula diana es un componente que se retira mientras el producto final queda en el sobrenadante y se purifica por medio de la retirada de la molécula diana. Cuando se usa la presente invención para la purificación y separación de fragmentos de Fab y Fc, por ejemplo es posible que la molécula diana que se precipita sea el producto deseado, pero también es posible precipitar un tipo de fragmentos mientras el producto deseado es el fragmento restante en el sobrenadante. En cualquier caso, el componente que se precipita se denomina molécula diana.

25 El término "anticuerpo" hace referencia a una proteína que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Típicamente, los anticuerpos tienen una estructura de cadena básica de cuatro-polipéptidos que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, estando dichas cadenas estabilizadas, por ejemplo, por medio de enlaces de disulfuro intercatenarios. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden existir en forma monomérica o polimérica, por ejemplo, anticuerpos IgM que existen en forma pentamérica y/o anticuerpos IgA que existen en forma monomérica, dimérica o multimérica. Los anticuerpos también pueden incluir anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo con tal de que conserven, o se modifiquen para comprender, un dominio de unión específico de ligando. El término "fragmento" hace referencia a una parte de un anticuerpo y/o cadena de anticuerpos que comprende menos residuos de amino ácido que un anticuerpo o cadena de anticuerpos intacta o completa. Los fragmentos se pueden obtener por medio de tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadenas de anticuerpos intacta o completa. También se pueden obtener los fragmentos por medios recombinantes. Cuando se producen de forma recombinante, los fragmentos se pueden expresar solos o como parte de una proteína más grande denominada proteína de fusión. Los fragmentos a modo de ejemplo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fc y/o Fv. Las proteínas de fusión a modo de ejemplo incluyen proteínas de fusión Fc. De acuerdo con la presente invención, las proteínas de fusión también quedan englobadas por el término "anticuerpo".

40 Como se ha analizado anteriormente, en algunas realizaciones, un anticuerpo es una proteína que contiene una región Fc, por ejemplo, una inmunoglobulina. En algunas realizaciones, una proteína que contiene una región Fc es una proteína recombinante que incluye la región Fc de una inmunoglobulina condensada a otro polipéptido o un fragmento del mismo. Los polipéptidos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, renina; una hormona del crecimiento, que incluye la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante tiroidea; lipoproteínas; α -1-antitripsina; insulina cadena- α ; insulina cadena- β ; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrands; factores anti-coagulación tales como Proteína C; factor natriurético atrial; tensioactivos pulmonares; un activador de plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factores α y β de necrosis tumoral; encefalina; RANTES (regulado sobre activación normalmente de célula-T expresada y eliminada); proteína inflamatoria de macrófago humana (MIP-1-- α); una alúmina de suero tal como albúmina de suero humano; sustancia inhibidora de mulleriana; relaxina cadena- α ; relaxina cadena- β ; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; proteína microbiana, tal como tal como β -lactamasa; DNasa; IgE; antígeno citotóxico asociado a linfocito-T (CTLA) (por ejemplo, CTLA-4); inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; Proteína A o D; factores reumatoides; factor neurotrófico tal como factor neurotrófico de procedencia ósea (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o factor de crecimiento de nervio tal como NGF- β ; factor de crecimiento procedente de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como α FGF y β FGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factores de crecimiento transformante (TGF), tales como TGF- α y TGF- β , incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, o TGF- β 5; factor-I y II de crecimiento similar a insulina (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro), proteínas de unión a factor a factor de crecimiento de tipo insulina (IGFBP); proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD 19 CD20, CD34 y CD40; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón- α , - β y - γ ; factores estimulantes de

colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de membrana superficial; factor de aceleración de desintegración; antígeno vírico tal como, por ejemplo, una parte de envoltura de SIDA; proteínas transportadoras; receptores de migración dirigida; adreínas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CDI Ia, CDI Ib, CDI Ic, CD 18, un ICAM, VLA-4 y VCAM; antígeno asociado a tumor tal como HER2, receptor HER3 o HER4; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de los polipéptidos listados con anterioridad. Además, un anticuerpo de acuerdo con la presente invención es cualquier proteína o polipéptido, fragmento o variante del mismo, que se une específicamente a cualquiera de los polipéptidos listados con anterioridad.

Tal y como se usa en la presente memoria y a menos que se afirme lo contrario, el término "muestra" hace referencia a cualquier composición o mezcla que contenga una molécula diana. Las muestras procedentes de fuentes biológicas u otras fuentes. Las fuentes biológicas incluyen fuentes eucariotas o procariontes, tales como células animales y vegetales, tejidos y órganos. Las muestras preferidas proceden de un fluido de cultivo celular tal como un cultivo celular de mamífero, por ejemplo CHO, NS-0, SP2/0, BioWa, cultivo de células bacterianas, por ejemplo E. coli, B. subtilis, cultivo celular de levadura u hongos filamentosos. La muestra también puede incluir diluyentes, tampones, detergentes y especies contaminantes, residuos y similares que se encuentran mezcladas con la molécula diana. La muestra se puede "purificar parcialmente" (es decir, someterse a una o más etapas de purificación, tales como etapas de filtración) o se puede obtener directamente a partir de una célula hospedadora u organismo que produce la molécula diana (por ejemplo, la muestra puede comprender un fluido de cultivo celular recogido).

El término "impureza" o "contaminante" tal y como se usa en la presente memoria, hace referencia a una molécula extraña o cuestionable, que incluye una macromolécula biológica tal como ADN, ARN, una o más proteínas de célula hospedadora, ácidos nucleicos, endotoxinas, lípidos, impurezas de origen sintético y uno o más aditivos que pueden estar presentes en una muestra que contiene la molécula diana que se separa de uno o más de las moléculas extrañas o cuestionables usando un proceso de la presente invención. Adicionalmente, dicha impureza puede incluir cualquier reactivo que se usa en una etapa que puede tener lugar antes del método de la invención.

Los términos "purificar", "separar", o "aislar", como se usan de manera indistinta en la presente memoria, hacen referencia a aumentar el grado de pureza de la molécula diana por medio de separación de la misma de una composición o muestra que comprende la molécula diana y uno o más de los otros componentes, por ejemplo impurezas. Típicamente, el grado de pureza de la molécula diana aumenta retirando (completa o parcialmente) al menos una impureza de la composición.

El término "cromatografía" hace referencia a cualquier tipo de técnica que separa un analito de interés (por ejemplo, una molécula diana) de otras moléculas presentes en la mezcla. Normalmente, la molécula se separa de otras moléculas como resultado de las diferencias en las tasas a las cuales las moléculas individuales de la mezcla migran a través de un medio estacionario bajo la influencia de una fase móvil, o en procesos de elución y unión.

La expresión "cromatografía de afinidad" hace referencia a una técnica de separación de proteínas en la que una molécula diana (por ejemplo, una proteína que contiene región Fc de interés o anticuerpo) se une específicamente a un ligando que es específico para la molécula diana. Dicho ligando generalmente hace referencia a un ligando bioespecífico. En algunas realizaciones, el ligando bioespecífico (por ejemplo, Proteína A o una variante funcional de la misma) se une covalentemente a un material de matriz cromatográfica y es accesible a la molécula diana en disolución a medida que la disolución entra en contacto con la matriz cromatográfica. Generalmente, la molécula diana conserva su afinidad específica de unión por el ligando bioespecífico durante las etapas cromatográficas, mientras que otros solutos y/o proteínas de la mezcla no se mezclan apreciablemente o específicamente con el ligando. La unión de la molécula diana con el ligando inmovilizado permite que las proteínas contaminantes o las impurezas de proteínas pasen a través de la matriz cromatográfica, al tiempo que la molécula diana permanece unida específicamente al ligando inmovilizado sobre el material de la fase sólida. La molécula diana específicamente unida se retira posteriormente en forma activa del ligando inmovilizado en condiciones apropiadas (por ejemplo, pH bajo, pH elevado, contenido de sal elevado, ligando en competición, etc.) y se hace pasar a través de la columna cromatográfica con tampón de elución, libre de proteínas contaminantes o impurezas de proteínas que se hubieran permitido pasar a través de la columna con carácter previo. Se puede usar cualquier componente como ligando para la purificación de su respectiva proteína de unión específica, por ejemplo, un anticuerpo. No obstante, en varios métodos de acuerdo con la presente invención, se usa la Proteína A como ligando para la molécula diana que contiene la región Fc. Las condiciones de elución a partir del ligando bioespecífico (por ejemplo, la Proteína A) de la molécula diana (por ejemplo, una proteína que contiene región Fc) se puede determinar fácilmente por parte del experto común en la técnica. En algunas realizaciones, se pueden usar la Proteína G o la Proteína L o una variante funcional de las mismas como ligando bioespecífico. En algunas realizaciones, se usa un ligando bioespecífico tal como Proteína A en un intervalo de pH de 5-9 para la unión a una proteína que contiene una región Fc, lavar o re-equilibrar el conjugado de ligando bioespecífico/molécula diana, seguido de elución con un tampón que tiene un pH de aproximadamente o menor de 4 que contiene al menos una sal.

El término "unión", tal y como se usa en la presente memoria para describir interacciones entre una molécula diana

(por ejemplo, una proteína que contiene región Fc) y una molécula copolimérica hace referencia a la unión generalmente reversible de la molécula diana a una molécula copolimérica a través de los efectos combinados de complementariedad espacial de, por ejemplo, las estructuras de proteína y copolímero en un sitio de enlace acoplado con fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas y/o fuerzas de van der Waals en el sitio de unión. En general, cuanto mayor sea la complementariedad espacial y cuanto más fuertes sean las otras fuerzas en el sitio de unión, mayor será la especificidad de unión de una proteína con respecto a su ligando respectivo. Los ejemplos no limitantes de unión específica incluyen unión de anticuerpo-antígeno, unión de enzima-sustrato, unión de enzima-cofactor, quelación de ion metálico, unión de ADN-proteína de unión a ADN, interacciones proteína-proteína reguladoras, y similares. Idealmente, la afinidad cromatográfica específica tiene lugar con una afinidad de aproximadamente 10^{-4} a 10^{-8} M en disolución libre.

Un "tampón" es una disolución que soporta cambios de pH por medio de la acción de sus componentes conjugados de ácido-base. Se pueden emplear diversos tampones que dependen, por ejemplo, del pH deseado del tampón y se describe en *Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems*, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975). Los ejemplos no limitantes de tampones incluyen MES, MOPS, MOPSO, Tris, HEPES, fosfato, acetato, citrato, succinato y tampones de amonio, así como también las combinaciones de éstos.

De acuerdo con la presente invención, el término "tampón" se usa para cualquier composición líquida que se use

- a) para ajustar el pH y/o la fuerza iónica u otros atributos físicos o químicos de la disolución que contiene la molécula diana o cualquier otra molécula usada dentro del alcance de la presente invención,
- b) para lavar la molécula diana precipitada o cualquier otra molécula usada dentro del alcance de la presente invención,
- c) para redissolver la molécula diana precipitada o cualquier otra molécula usada dentro del alcance de la presente invención

De acuerdo con la presente invención, el término "polimerización" o la expresión "síntesis de copolímeros" se pueden usar de manera intercambiable y pueden hacer referencia a una síntesis de copolímero o polímero que emplea una de las siguientes técnicas, pero sin limitación: polimerización de radicales libres, polimerización de radicales en desarrollo (ATRP, RAFT, NMP etc.), polimerización aniónica o catiónica, polimerización por condensación o cualquier tipo de polimerización con apertura de anillo. La polimerización por radicales libres se puede iniciar por ejemplo, térmica, fotoquímicamente, a través de reacción redox o por vía electroquímica.

De acuerdo con la presente invención, la relación de monómero es la relación molar de un tipo de monómero presente en el copolímero con respecto a otros tipos de monómeros presentes en el copolímero.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionar el peso molecular de un copolímero en términos de peso molecular promedio expresado en peso (abreviado como Mw cuando se habla de copolímeros de la presente invención), según se determina por cromatografía de permeación en gel, un método convencional para determinar el peso molecular de un copolímero, conocido de este modo por una persona experta en la técnica. De acuerdo con la presente invención, el término polidispersidad es la relación de peso molecular promedio expresado en peso y peso molecular promedio expresado en número de un copolímero concreto.

"Alifático" o "grupo alifático" significan un resto de hidrocarburo no aromático, opcionalmente sustituido. El resto puede ser, por ejemplo, lineal, ramificado o cíclico {por ejemplo, mono- o policíclico tal como condensado, con puente o policíclico espiro-condensado) o una combinación de los mismos. A menos que se especifique de otro modo, los grupos alifáticos contienen 1-30 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 20, átomos de carbono. Los grupos alifáticos preferidos son grupos alquilo.

Los "grupos alquilo" descritos en la presente memoria tienen un contenido de alquilo preferentemente más bajo que contiene de uno a 20 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 8 átomos de carbono, en la cadena principal y hasta 30 átomos de carbono juntos. Pueden ser lineales, ramificados o cíclicos e incluir metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo y similares.

La expresión "grupo aromático" hace referencia a sistemas de anillo monocíclicos opcionalmente sustituidos, bicíclicos y tricíclicos que tienen un total de cinco a catorce miembros de anillo, donde al menos un anillo del sistema es aromático y donde cada anillo del sistema contiene de tres a siete miembros del anillo. Se prefieren los grupos monocíclicos o bicíclicos que contienen de 6 a 12 carbonos en la parte de anillo, tales como fenilo, bifenilo, naftilo, fenilo sustituido, bifenilo sustituido o naftilo sustituido.

Un "grupo hidrófobo" es un resto tal como un sustituyente o residuo que, cuando se une covalentemente a una molécula, tal como un monómero o polímero, en lugar de un átomo de hidrógeno, aumenta la naturaleza hidrófoba

de la molécula.

Descripción detallada de la invención

Síntesis/propiedades de copolímero

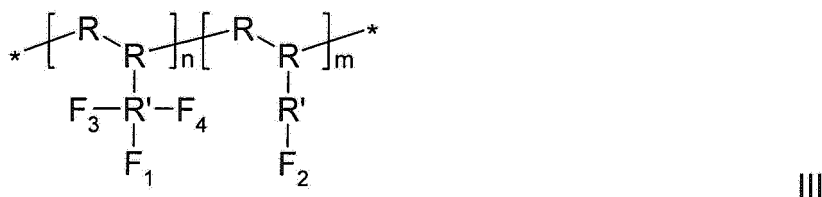
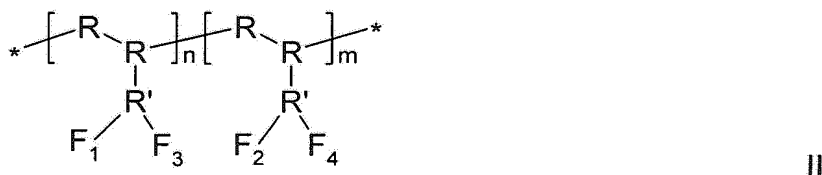
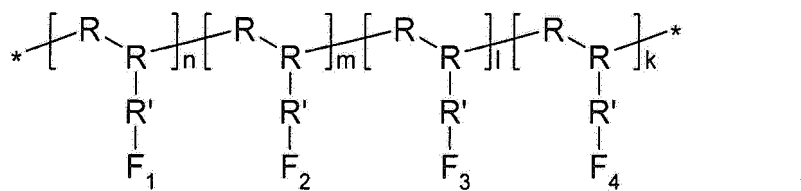
De acuerdo con la presente invención, un copolímero es un polímero que consiste en al menos dos tipos diferentes de monómeros. Preferentemente, el copolímero es lineal y es soluble en agua y tampones acuosos, preferentemente en condiciones salinas fisiológicas, que comprenden, por ejemplo, una conductividad de 10-20 mS/cm, medido a 20 °C. El copolímero a usar en el método de la presente invención comprende al menos un tipo de grupo aniónico y al menos un tipo de grupo hidrófobo. En una realización, contiene únicamente grupos aniónicos e hidrófobos. De acuerdo con la presente invención, la expresión "grupo aniónico" hace referencia a grupos negativamente cargados presentes en el copolímero. Resulta obvio para la persona experta en la técnica que la carga del grupo aniónico puede únicamente estar presente en determinadas condiciones de pH pero en estado no cargado los grupos aniónicos son capaces de convertirse en aniómicamente cargados, por ejemplo, tras la retirada de un electrófilo (por ejemplo, un protón (H(+)), por ejemplo de forma dependiente del pH). El grupo aniónico puede ser capaz de interacciones electrostáticas y puede ser un intercambiador iónico fuerte, intercambiador iónico débil y/o capaz de formar complejos con iones metálicos. La unidad monomérica apropiada para introducir un grupo aniónico en el copolímero es ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico (AMPS), ácido vinilsulfónico VS, ácido estireno sulfónico o ácido (met)acrílico.

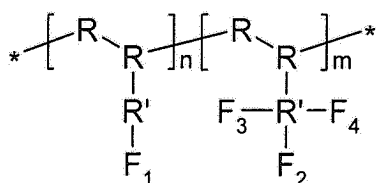
La unidad monomérica apropiada para introducir un grupo hidrófobo en el copolímero de benciocrilamida (BzAam) o metacrilato de bencilo (BzMA), N-isopropilacrilamida (NIPAM), metacrilato de metilo (MMA), acrilato de butilo, acrilato de *terc*-butilo o ácido 4-(acriloilamido)benzóico (4-ABZ).

El copolímero de acuerdo con la presente invención típicamente comprende una cadena principal copolimérica a la cual se unen los grupos aniónicos e hidrófobos. Típicamente, el copolímero se sintetiza por medio de polimerización de unidades monoméricas.

En la Fórmula I a IV, se proporcionan representaciones esquemáticas de posibles copolímeros. El copolímero puede ser un copolímero aleatorio o de bloques, preferentemente aleatorio. Las siguientes definiciones aplican:

- R = cadena principal polimérica
- R' = espaciador, que pueden o no estar presentes en el polímero
- F = grupo funcional (F1 = grupo aniónico, F2 = grupo hidrófobo, F3 y F4 = independiente de cada grupo funcional o -H,
- n > 0, m > 0, l ≥ 0, k ≥ 0





IV

En la Tabla 1, se definen ejemplos de cadena principal de polímero (R) y los grupos laterales de un polímero, de manera que el grupo lateral denominado de este modo consiste en un grupo funcional (F) y un espaciador (R') o un grupo funcional (F) solo si no existe espaciador alguno (R') presente.

- 5 En una realización preferida, cada unidad monomérica que se usa para sintetizar el copolímero tiene al menos un grupo aniónico o hidrófobo.

Tabla 1: bloques estructurales para polímeros.

cadena principal polimérica (R)	polímeros de vinilo, poliéteres, poliésteres, poliamidas	ejemplos: polimetilmetacrilato, polimetacrilato, poli(acetato de vinilo), poliacrilamida, poli(ácido acrílico), poliacrilonitrilo, poliestireno, poli(metilestireno), polivinilpiridina, polivinilpirrolidona, polietileno, polibutadieno, poliisopreno, óxido de polietileno, polietilenglicol, poli(tereftalato de etileno, policaprolactama, poli(fenilen tereftalamida), etc.
espaciador (R')	alquilo (lineal, ramificado, cíclico) alquilo sustituido con halógeno (lineal, ramificado, cíclico) aromáticos heteroaromáticos heteroaromático o aromático sustituido con halógeno éster éter amida	
grupo funcional (F)	grupo aniónico capaz de interacciones pi-pi grupo capaz de interacciones electrostáticas grupo hidrófobo	Ejemplos:

Se pueden obtener muy buenos resultados con polímeros formados al menos por AMPS y 4-ABZ, así como también AMPS y BzAAm.

- 10 Los copolímeros útiles para el método de la invención típicamente tienen un peso molecular promedio expresado en peso que varía de aproximadamente mil (1000) g/mol a 1.100.000 g/mol y/o polidispersidades entre 1,052,5. Los copolímeros de la invención se pueden usar como mezcla de copolímeros que comprende el mismo tipo de unidades monoméricas pero con una amplia gama de longitudes de cadena, es decir, una gama de peso molecular promedio expresado en peso de aproximadamente 1000 g/mol a aproximadamente un millón (1.000.000) g/mol, preferentemente con polidispersidades entre 1,05-2,5. La mezcla también puede tener una gama estrecha de peso molecular promedio expresado en peso, por ejemplo de aproximadamente 35.000 a aproximadamente 45.000 g/mol, o de aproximadamente 50.000 g/mol a aproximadamente 55.000 g/mol, preferentemente todos con polidispersidades entre 1,05-2,5. El peso molecular promedio expresado en peso y el perfil de la distribución de peso molecular se pueden controlar en determinadas condiciones de polimerización de las unidades monoméricas tales como
- 15 concentración, iniciación de polimerización o catalizador, temperatura o tiempo. El peso molecular promedio expresado en peso de los copolímeros preferentemente está entre 10.000 y 120.000 g/mol, del modo más preferido entre 35.000 y 60.000 g/mol, preferentemente con polidispersidades entre 1,05-2,5.
- 20

- Entre el número total de grupos aniónicos e hidrófobos, típicamente de un 10 a un 90 % de los grupos son grupos aniónicos. Preferentemente del 35 al 65 %, lo más preferido de un 45 a un 60 % del número total de los grupos
- 25 aniónicos e hidrófobos son grupos aniónicos.

Los copolímeros se pueden sintetizar para cumplir específicamente los requisitos con el fin de precipitar

selectivamente diversas moléculas diana, por ejemplo, mediante el empleo de copolímeros de peso molecular definido, longitud de cadena o grado de naturaleza hidrófoba y composición definidos.

Proceso de precipitación

5 El método de la presente invención va destinado a la purificación de una molécula diana que típicamente está presente en una muestra biofarmacéutica usando copolímeros que comprenden grupos aniónicos e hidrófobos. Cuando se añaden los copolímeros a la disolución de muestra, los copolímeros se unen a las moléculas diana y precipitan. Para obtener buenos resultados de precipitación, se proporciona la muestra y se ajusta a determinadas condiciones como concentración de molécula diana, pH y fuerza iónica. Esto se puede llevar a cabo antes de la adición del copolímero o en paralelo. Se ha encontrado que con el uso de copolímeros de acuerdo con el método de la presente invención, es posible lograr buenos resultados de precipitación incluso si la muestra tiene una fuerza iónica elevada hasta una conductividad de 22,5 mS/cm, medida a 20 °C. Típicamente, la fuerza iónica de la muestra se debería ajustar usando métodos de dilución apropiados hasta una conductividad de 0 mS/cm hasta 22,5 mS/cm, preferentemente hasta una conductividad de 0 mS/cm a 17 mS/cm, con una conductividad determinada a 20 °C. Al contrario que muchos procedimientos conocidos, el método de la presente invención permite la precipitación efectiva de la molécula diana incluso a una fuerza iónica entre conductividad de 10 mS/cm a 22,5 mS/cm, determinada a 20 °C. La fuerza iónica se puede modificar o reducir por medio del uso de técnicas de dilución apropiadas o técnicas de intercambio de tampón.

20 En casos específicos, puede ser necesaria notablemente la separación de Fab de la región Fc tras el tratamiento enzimático de un anticuerpo monoclonal, el ajuste de la fuerza iónica entre conductividad de 8 mS/cm a 22,5 mS/cm, para permitir la precipitación selectiva. Preferentemente, para la separación de Fab de la región Fc, se ajusta la fuerza iónica a conductividades entre 9 mS/cm y 18 mS/cm, del modo más preferido entre 10 y 16 mS/cm.

25 Preferentemente, el pH se ajusta usando métodos apropiados para lograr un pH más bajo que el punto isoeléctrico (pI) de la molécula diana y, si resulta aplicable a un pH por encima del punto isoeléctrico de las proteínas de impureza o la mayoría de las proteínas de impureza. Típicamente, se ha encontrado que el pH se debería ajustar de 4 a 7, preferentemente de 4 a 5,5. Especialmente cuando se produce la precipitación de los anticuerpos monoclonales con punto isoeléctrico entre 7 y 9 a partir de los fluidos de cultivo celular como NS0, CHO-S o SP2/0, un pH entre 4 y 5,5, especialmente a pH entre 5,0 y 5,2 resulta muy apropiado.

30 En casos específicos, puede ser necesaria notablemente la separación de Fab de la región Fc tras el tratamiento enzimático de un anticuerpo monoclonal, el ajuste del pH a un valor entre 4 y 5,5, especialmente a pH entre 5,0 y 5,2 resulta muy apropiado.

La cantidad de polímero a usar para el método de la presente invención depende de la cantidad de molécula diana que esté presente en la muestra. Típicamente, se pueden obtener buenos resultados cuando se usa entre 0,2 y 1,2 mg de copolímero por mg de molécula diana. Preferentemente, se añaden entre 0,35 y 0,9 mg de copolímero por mg de molécula diana.

35 Para lograr una precipitación óptima, tras añadir el copolímero a la disolución de muestra, preferentemente se incuba la mezcla. Los tiempos típicos de incubación están entre 10 minutos y 2 horas. Preferentemente, la mezcla se agita durante la incubación, por ejemplo, en un agitador o agitador magnético.

40 A continuación, el co-precipitado que comprende la molécula diana y el copolímero se puede aislar del sobrenadante, por ejemplo, mediante filtración, sedimentación, centrifugación o cualquier otro medio. Típicamente, el co-precipitado que comprende la molécula diana posteriormente se somete a etapas de procesamiento adicionales para aislar o purificar de forma adicional la molécula diana. Pero también es posible someter el sobrenadante a etapas de proceso adicionales. Por ejemplo el caso de que la molécula diana sea una sustancia conocida que se deba retirar de la muestra (por ejemplo, la región Fc de un anticuerpo) pero el producto que se aísle finalmente y se purifique a partir de la muestra sea otra molécula que tras llevar a cabo el proceso de la presente invención se encuentre presente en el sobrenadante (por ejemplo, región Fab de un anticuerpo).

50 Pero en la mayoría de los casos, la molécula diana que se ha precipitado mediante adición del copolímero es el copolímero que se debería purificar de forma adicional. En este caso, el co-precipitado que comprende la molécula diana se puede lavar una o varias veces por ejemplo con un tampón ácido. Preferentemente, el tampón de lavado tiene el mismo pH y la misma fuerza iónica o menor que la mezcla obtenida tras la adición del copolímero a la muestra.

A continuación, el co-precipitado se puede re-disolver. Esto se puede llevar a cabo en un tampón acuoso que tenga un pH por encima de una unidad de pH por debajo del punto isoeléctrico de la molécula diana. Típicamente, se usa un tampón con un pH entre 7 y 9 para redissolver el co-precipitado, por ejemplo, un tampón Tris pH 8,0 o Tampón Fosfato-Na-K pH 7,4 (PBS). La re-disolución puede venir acompañada por ejemplo de agitación o agitación

mecánica, por ejemplo, agitación durante 5 a 20 minutos a 300 a 600 rpm.

En una realización de la presente invención, para obtener la molécula diana altamente purificada, en una etapa posterior del método de acuerdo con la presente invención, el copolímero se puede retirar de la disolución que comprende el co-precipitado re-disuelto. Esto se puede llevar a cabo por medio de varios métodos como métodos
5 cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de interacción hidrófila o cromatografía de afinidad. También es posible re-precipitar el copolímero mediante la adición de un agente de precipitación. Los agentes de precipitación apropiados son, por ejemplo, perlas a las cuales los polielectrolitos se unen de manera covalente. Los polielectrolitos son polímeros cuyas unidades de repetición portan un grupo electrolito. Los policationes y polianiones son
10 polielectrolitos. Los ejemplos de perlas apropiadas son por ejemplo perlas de vidrio, perlas de sílice o perlas poliméricas. Los polielectrolitos apropiados son, por ejemplo, polielectrolitos, polielectrolitos en modo mixto, polielectrolitos hidrófobos o polielectrolitos hidrófilos capaces de enlace-H.

Las perlas apropiadas se divulgan, por ejemplo, en el documento US 5.922.531.

En una realización preferida, las perlas son perlas de vidrio o sílice, más preferentemente escamas de vidrio o mica
15 o sílice. Se ha encontrado que las escamas de sílice o vidrio con una velocidad de sedimentación entre 0,8 y 1,2 cm/minuto son especialmente apropiada para la re-precipitación. Típicamente, las escamas de vidrio o sílice con un diámetro que varía de 10-200 μM y espesores entre 100 y 1000 nm muestran dicha velocidad de sedimentación apropiada y son especialmente apropiadas para la re-precipitación de los copolímeros. En una realización preferida, las perlas de vidrio o sílice y también otros tipos de perlas están funcionalizadas con grupos catiónicos o grupos
20 catiónicos e hidrófobos o hidrófilos. Preferentemente, la funcionalización se lleva a cabo por medio de unión covalente de los polielectrolitos catiónicos o polielectrolitos con funcionalidades hidrófilas o hidrófobas y catiónicas. Se prefieren especialmente los polielectrolitos que comprenden TMAE y DMAE. Las perlas se añaden típicamente a la disolución de copolímero-molécula-diana re-suspendida para alcanzar una concentración final de perlas o escamas en la mezcla final de entre 0,0001 y 0,5 mg/ml.
25 Típicamente, las perlas se añaden a la disolución de copolímero-molécula diana re-suspendida tras ajustar el pH de la disolución a un valor de 7,0-8,5.

Tras retirar las perlas con el copolímero unido, por ejemplo, mediante centrifugación, sedimentación o filtración, se obtiene el sobrenadante que comprende la molécula diana altamente pura y con escasa o nula contaminación de
30 copolímero. Típicamente, el copolímero se puede retirar hasta > 90 % (peso/peso) en comparación con la concentración inicial de copolímero en la muestra, usando estas escamas de sílice. Mediante el ajuste de la concentración de estas escamas de sílice, el copolímero se puede retirar hasta típicamente > 95 % (peso/peso) hasta un 99 % (peso/peso) en comparación con la concentración inicial de copolímero en la muestra.

El método de la invención reduce las impurezas y evita la obstrucción de etapas de purificación posteriores como cromatografía, filtración o centrifugación. El método de la presente invención puede sobre-concentrar la molécula
35 diana por medio de precipitación selectiva y posterior re-disolución en un volumen definido, logrando factores de concentración de hasta 100, aumentando de este modo el tiempo de procesado para las etapas de purificación posteriores y reduciendo la carga de trabajo para la cromatografía (horas/kg de molécula diana purificadas en cromatografía).

Aunque, con frecuencia, el uso de los polímeros para la precipitación divulgados en la técnica anterior proporciona
40 rendimientos de purificación elevados, únicamente funciona suficientemente a una fuerza iónica tan baja como una conductividad de 5 mS/cm o menos como se muestra en las presentes publicaciones.

No obstante, esta restricción requiere la dilución del fluido de cultivo celular antes de la aplicación de los polímeros para la precipitación, por ejemplo, montaje de 75000 litros de fluido de cultivo celular diluido y más, en comparación
45 con 25000 litros de fluido de cultivo celular inicial.

No es necesario atenuar y almacenar estos grandes volúmenes, y tener una carga residual elevada tras la purificación, que conduzcan todos ellos a costes elevados.

En contra de estas restricciones y desventajas, el método de la presente invención permite a los clientes usar copolímeros específicamente optimizados con el fin de obtener un rendimiento y pureza elevados de la molécula
50 diana, incluso a una fuerza iónica similar a las condiciones de sal fisiológica. De este modo, no se requieren etapas de pre-dilución excesivas.

La invención se puede sustituir total o parcialmente, por etapas de purificación usadas hasta la fecha de una proteína recombinante o biofarmacéutica, lo cual conduce a un rendimiento, tiempo de purificación, eficiencia, pureza igual o mejor.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos representan posibles etapas de síntesis para obtener los copolímeros usados en el método de la invención.

Ejemplo 1a:

5 Se disuelven 4,92 g de ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico y 6,82 g de ácido 4-acrilamido benzoico en una mezcla de 300 ml de agua/DMF (1/1) y 3,4 ml de disolución de NaOH (32 %). La disolución se desgasifica usando nitrógeno. Se añaden 0,436 g de peroxodisulfato de sodio disuelto en agua desgasificada a la disolución. Se eleva la temperatura a 80 °C. Tiempo de reacción es de 5 horas. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente y se expone al aire. Se retira el disolvente con un evaporador rotatorio. Se disuelve el polímero sólido de nuevo en agua y se precipita en 2-propanol. Se filtra y se seca el polímero. El peso molecular promedio expresado en peso es de aproximadamente $M_w = 100\ 000$ g/mol, con una polidispersidad de 1,3.

Ejemplo 1b:

15 Como en el ejemplo 1a, pero la purificación del polímero usando una columna Sephadex® (gel de dextrano reticulado). Se lava la columna con 5 x 5 ml de agua, se "inyectan" 2,5 ml de mezcla de reacción y se lava la columna con 3,5 ml de agua. Se recoge la fracción eluida y se lleva a cabo el re-equilibrado con 7 x 5 ml de agua. Se repite el procedimiento 3 veces. Se retira el disolvente de la fracción eluida usando un evaporador rotatorio y se seca el polímero.

Ejemplo 1c:

20 Como en el ejemplo 1a, pero la purificación a través de diálisis o filtración de flujo tangencial. Después de la reacción, la mezcla se enfría a temperatura ambiente y el disolvente se retira con un evaporador rotatorio. Se disuelve el polímero sólido de nuevo en agua y se purifica el polímero con diálisis usando un MWCO apropiado de por ejemplo 12 000 - 14 000 Da o filtración de flujo tangencial.

Ejemplo 2a:

25 Se disuelven 4,92 g de ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico y 6,82 g de ácido 4-acrilamido benzoico en una mezcla de 300 ml de agua/DMF (1/1) y 3,4 ml de disolución de NaOH (32 %). 95 µl de 1-butanotiol (como agente de transferencia de cadena). La disolución se desgasifica usando nitrógeno. Se añaden 0,436 g de peroxodisulfato de sodio disuelto en agua desgasificada a la disolución. Se eleva la temperatura a 80 °C. Tiempo de reacción es de 5 horas. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente y se expone al aire. Se retira el disolvente con un evaporador rotatorio. Se disuelve el polímero sólido de nuevo en agua y se precipita en 2-propanol. Se filtra y se seca el polímero. El peso molecular promedio expresado en peso es de aproximadamente $M_w = 55\ 000$ g/mol, con una polidispersidad de 1,16.

Ejemplo 2b:

Como en el ejemplo 2a, pero se añaden 380 µl of 1-butanotiol. El peso molecular promedio expresado en peso del polímero resultante es de aproximadamente $M_w = 35\ 000$ g/mol, con una polidispersidad de 1,6.

Ejemplo 3:

35 Como en el ejemplo 1, pero se usan diferentes relaciones molares de monómero:

ejemplo	ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico	ácido 4-acrilamido benzoico
3a	1	0
3b	1	0,3
3c	1	0,7
3d	1	1,5
3e	1	3
3f	0	1

Ejemplo 4:

Igual que en el ejemplo 3 pero en lugar de ácido 4-acrilamido benzoico, se usa benciocrilamida como co-monómero.

Los siguientes ejemplos muestran aplicaciones de la invención

Ejemplo 5:

Se trata una disolución de cultivo celular de anticuerpo monoclonal (fluido de cultivo celular SP2/0) con una valoración de anticuerpo monoclonal (mAb03) de 2,0 mg/ml (de acuerdo con cromatografía de afinidad de Proteína A), en la que la cantidad de HCP (proteína de célula hospedadora) es de 9000 ng/mg de anticuerpo (de acuerdo con el ensayo inmunoenzimático SP2/0) con copolímeros hidrófobos-aniónicos tras ajustar primero la disolución de cultivo celular a pH 5,0. Se sintetizar el copolímero con AMPS al 61,7 % (p/p) y (ABZ) al 38,3 % (p/p), usando peroxodisulfato de sodio al 3,17 % (p/p) y un agente de transferencia de cadena 1-butanodiol a una relación de 1:0,03 de concentración total de monómero (AMPS+ABZ) en moles.

La caracterización del polímero da lugar a ácido 4-(acrililamino)benzoico al 36 % (ABZ figura 1) (p/p); ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico al 64 % (AMPS figura 1) (p/p); determinado por medio de espectroscopia de infrarrojos con reflexión total atenuada; distribución de peso molecular determinada por medio de índice de refracción diferencial sobre SEC: Mw 28000 Da, Mn 13000 Da, índice de polidispersidad 2,1. Se ajusta el copolímero a una concentración de 10 mg/ml pH 5,0 y se añade en un volumen pequeño a la disolución de cultivo celular de anticuerpo hasta concentraciones finales que varían de 0,4 mg/ml de polímero hasta 1,2 mg/ml de polímero y concentraciones finales de 1,4 mg/ml (fuerza iónica: conductividad de 12 mS/cm o 120 mM de equivalentes de NaCl, medido a 20 °C).

Tras una hora de agitación magnética lenta, se centrifuga el cultivo celular de anticuerpo con copolímero añadido durante 15 minutos a 2500 rcf. Se descarta el sobrenadante y se redisuelve el gránulo en tampón de fosfato-Na-K de 80 mM pH 7,4 por medio de agitación durante 12 minutos a 500 rpm. Se añaden residuo de amoníaco cuaternario (trimetilaminoetil) unido a escamas de sílice al gránulo redisuelto a una relación de un 10 % (v/v), seguido de 10 minutos de centrifugación a 2500 rcf. Se retira el sobrenadante y se obtiene un rendimiento de retirada de copolímero de un 98,8 %, retirada de HCP de un 70 % y recuperación de anticuerpo de un 80 %, en comparación con la valoración inicial de anticuerpo. Los espectros IR (véase figura 2 adjunta) no muestran cambios significativos de la estructura secundaria del anticuerpo antes y después de la precipitación, seguido de redisolución. La interferometría de biocapa (BLI) no muestra diferencia alguna en la afinidad de unión del anticuerpo a su diana, en comparación con el anticuerpo no precipitado (véase figura 3 A adjunta) con el anticuerpo purificado usando precipitación y redisolución de acuerdo con la presente invención (véase figura 3 B adjunta).

Ejemplo 6:

Se trata una disolución que contiene 2 mg/ml de anticuerpo monoclonal (mAb03, mAb04, mAb05, mAb07, respectivamente, información adicional tabla 2) y 2 mg/ml de albúmina de suero bovino con diversos copolímeros aniónicos-hidrófobos después de ajustar la disolución de cultivo celular a un valor de pH 5,0. Los copolímeros (10-77,5 % ABZ (p/p); 22,5-90 % AMPS (p/p); se determinaron por medio de espectroscopia de reflexión total atenuada; la distribución de peso molecular se determinó por medio de índice de refracción sobre SEC: Mw 5000-300000 Da, Mn 5000-131000 Da, índice de polidispersidad 1-2,3; la distribución de peso molecular se determinó por medio de medición UV sobre SEC: Mw 5000-300000 Da, Mn 5000-131000 Da, índice de polidispersidad 1-2,5) se añaden a las disoluciones (cada copolímero en cada concentración, cada pH y fuerza iónica se añaden a un recipiente de disolución por separado) para constituir una disolución de copolímero-proteína con una concentración final de anticuerpos de 1 mg/ml de concentración final de BSA de 1 mg/ml, pH 5,0, fuerza iónica aproximadamente conductividad de 15 mS/cm, medida a 20 °C y concentración de copolímero de 0,1-1,5 mg/ml. Tras una hora de agitación a 300 rpm, se centrifuga la disolución de copolímero-proteína durante 15 minutos a 2500 rcf. Se descarta el sobrenadante y se redisuelve el gránulo en tampón de fosfato-Na-K de 80 mM pH 7,4 por medio de agitación durante 12 minutos a 500 rpm. Se añaden escamas de TMAE al 10 % (v/v) al gránulo re-disuelto, seguido de 10 minutos de centrifugación a 2500 rcf. Se retira el sobrenadante y se obtiene un rendimiento de retirada de copolímero de un 95 %, retirada de BSA de un 20-80 % y recuperación de anticuerpo de un 85 %, en comparación con la valoración inicial de anticuerpo. La mayoría de los copolímeros prometedores (10-70 % de ABZ, 30-90 % de AMPS, longitud de cadena promedio en peso < 80000 Da) dan lugar a una recuperación de mAb de un 85 % y retirada de BSA de un 80 %.

Tabla 2: proteínas diana usadas en experimentos de precipitación

proteína	Lisozima	ASC	mAb03	mAb04	mAb05	mAb07	Fab
punto isoeléctrico	10,7	4,9	8-9	8-9	8-9	7-8	8-9
peso molecular en kDa	14,3	66	150	150	150	150	~50
índice de hidropaticidad: Gravy	-0,472	-0,429	-0,413	-0,42	-0,343	-0,459	-0,310

Ejemplo 7:

Se ajusta una disolución de cultivo celular de anticuerpo monoclonal en estirpe celular CHO-S que contiene 0,7 mg/ml de anticuerpo monoclonal (mAb05) y una cantidad conocida de proteínas HCP/mg de anticuerpo a un valor de pH 5,0 y conductividad de 11 mS/cm, medido a 20 °C. Se trata la disolución con un copolímero aniónico-hidrófobo (65 % de ABZ, 35 % de AMPS; Mw 80000 Da, Mn 55000 Da, determinado por medio de índice de refracción diferencial en SEC) a una relación en peso final de copolímero con respecto a anticuerpo de 0,57:1 a 1,14:1. Tras agitar durante una hora a 300 rpm y centrifugar a 2500 rcf durante 15 minutos, se transfiere el sobrenadante y se analiza así como también el gránulo redisolto (tampón de fosfato-Na-K 80 mM pH 7,4 por medio de agitación durante 12 minutos a 500 rpm). Ambas determinaciones muestran una retirada de proteína de célula hospedadora de un 50 % y una precipitación de anticuerpos de un 80-90 %. El espectro de infrarrojo medio no revela cambios estructurales del anticuerpo antes y después de la precipitación coherentes con las búsquedas bibliográficas. La interferometría de biocapa no muestra cambio alguno en la afinidad de unión del anticuerpo antes y después de la precipitación.

Ejemplo 8:

Se ajusta una disolución que contiene la parte de Fab (unión antígeno de fragmento) de un anticuerpo monoclonal (mAb03) a una concentración de 2 mg/ml hasta un valor de pH 5,0 con una fuerza iónica a una conductividad de 2 mS/cm (medida a 20 °C) antes de añadir un 100 % (v/v) de un copolímero hidrófobo-aniónico (50 % de BzAAM, 50 % de AMPS; Mw 63000, Mn 46000, determinado por medio de medición de índice de refracción en SEC) hasta una concentración final de 0,1-0,8 mg/ml en la disolución de copolímero-Fab (fuerza iónica con conductividad de 1 mS/cm, pH 5,0). Se incuba la disolución en un agitador durante una hora a 300 rpm y se centrifuga durante 15 minutos a 2500 rcf. Se precipita un 80 % de Fab a partir de la disolución.

Ejemplo 9:

Se ajusta una disolución de cultivo celular de anticuerpo monoclonal en estirpe celular de mieloma murino (NSO) que contiene 2 mg/ml de anticuerpo monoclonal (mAb07) y una cantidad conocida de proteínas HCP/mg de anticuerpo un valor de pH 5,0 y conductividad de 12 mS/cm y se trata con un copolímero aniónico-hidrófobo (65 % de ABZ, 35 % de AMPS; Mw 80000 Da, Mn 55000 Da, determinado por medio de índice de refracción en SEC) a diversos valores de relación en peso final de copolímero con respecto a anticuerpo. Tras agitar durante una hora a 300 rpm y centrifugar a 2500 rcf durante 15 minutos, se transfiere el sobrenadante y se analiza así como también el gránulo redisolto (tampón de fosfato-Na-K 80 mM pH 7,4 por medio de agitación durante 12 minutos a 500 rpm). Ambas determinaciones muestran una retirada de proteína de célula hospedadora de un 50-70 % y una precipitación de anticuerpos de un 80-95 %.

Ejemplo 10:

como en el ejemplo 9, pero el volumen inicial de precipitación es de 20 ml y se redissuelve el gránulo de copolímero-molécula diana en 500 ul, aumentando la concentración de molécula-diana en un factor de 40.

Ejemplo 11:

Se ajusta una disolución que contiene fragmentos de Fab y Fc de un anticuerpo monoclonal tras digestión de papaína a un valor de pH 5,0 y conductividad de 14 mS/cm. Se trata la disolución con un copolímero aniónico-hidrófobo (64 % de ABZ, 36 % de AMPS; Mw 160.000 Da, Mn 55000 Da, determinado por medio de índice de refracción en SEC) a diversos valores de relación en peso final de copolímero con respecto a proteína total. Tras agitar durante una hora a 300 rpm y centrifugar a 2500 rcf durante 15 minutos, se transfiere el sobrenadante y se analiza así como también el gránulo redisolto (tampón de fosfato-Na-K 80 mM pH 7,4 por medio de agitación durante 12 minutos a 500 rpm). El gránulo consistió únicamente en un fragmento Fc, aunque el sobrenadante estuvo formado por un 10 % de Fc no precipitado y un 100 % de fragmento de Fab empleado de forma inicial.

Ejemplo 12:

Síntesis TMAE-escama de vidrio de diol o sílice:

Se sintetizar escamas de vidrio de diol o sílice usando escamas de vidrio de diol o escamas de sílice revestidas con glicidilpropiltriethoxisilano con un diámetro de 10-100 µm y monómeros de adición N,N-dimetiletildiamina (0,225 M), cloruro de ácido acrílico (0,216 M) y dimetilsulfato (0,228 M), usando nitrato de amonocerio-IV 4,5 mM como iniciador.

Otras cuestiones

Se caracterizan las composiciones de copolímero usando espectroscopia de RMN así como también espectroscopia de reflexión total atenuada (ATR) con espectroscopia de infrarrojos. Los resultados son comparables entre RMN y ATR (tabla 3), lo que muestra la idoneidad de ATR para la caracterización del copolímero.

Tabla 3: Comparación de ATR-IR vs RMN para el análisis del copolímero

Copolímero	RMN			ATR			Relación durante la síntesis		
	% (p/p) AMPS	% (p/p) BzAAm	% (p/p) ABZ	% (p/p) AMPS	% (p/p) BzAAm	% (p/p) ABZ	% (p/p) AMPS	% (p/p) BzAAm	% (p/p) ABZ
pol35	19		81	20		81	27		73
pol30	36		64	37		63	42		58
pol12	43	57		48	52		63	47	
pol8	54	46		54	46		49	51	

La Tabla 4 muestra ejemplos de copolímeros a usar de acuerdo con el método de la presente invención que se han preparado de acuerdo con los procedimientos descritos en los Ejemplos 1-4.

Tabla 4

Copolímero	% (p/p) AMPS por medio de ATR	% (p/p) ABZ por ATR	% (p/p) BzAAm por ATR	Mw (g mol ⁻¹ por medio de índice de refracción de SEC)
pol1	95	0	5	56000
pol2	93	0	7	28244
pol3	82	0	18	78000
pol4	81	0	19	46014
pol5	81	0	19	112873
pol7	54	0	46	11757
pol8	54	0	46	44000
pol10	49	0	51	63000
pol12	36	0	64	9136
pol15	38	0	62	63000
pol16	83	17	0	82000
pol18	61	39	0	114000
pol19	65	35	0	38800
pol20	59	41	0	66690
pol21	59	41	0	34600
pol22	49	51	0	58700
pol23	44	56	0	81000
pol24	43	57	0	95000
pol26	39	61	0	124000
pol30	37	63	0	43000
pol33	27	73	0	75000
pol35	20	80	0	108000

- 5 La Tabla 5 muestra la fuerza iónica de los sistemas de expresión de proteína usados en los experimentos de precipitación.

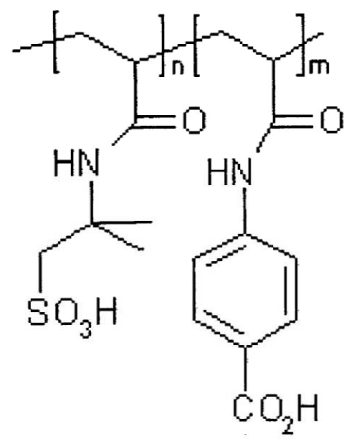
Tabla 5:

sistema de expresión de proteínas	<i>E. coli</i>	células de ovario de hámster chino (CHO)	CHO-DG44	mieloma murino (NSO)	SP2/0
fuerza iónica (conductividad medida a 20 °C)	10-15mS/cm	~ 11-17mS/cm	~ 11-17mS/cm	~ 11-17mS/cm	~ 11-17mS/cm

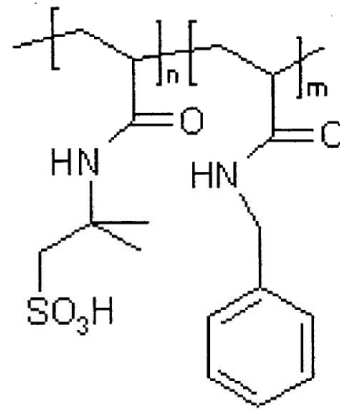
REIVINDICACIONES

1. Método de aislamiento de una molécula diana a partir de una muestra que comprende:
 - a) proporcionar la muestra
 - 5 b) mezclar uno o más copolímeros sintetizados a partir de unidades monoméricas de manera que cada unidad monomérica que se usa para sintetizar el copolímero tenga al menos un grupo aniónico o hidrófobo y la unidad monomérica que tiene al menos un grupo esté seleccionada entre bencilacrilamida (BzAAM), metacrilato de bencilo (BzMA), N-isopropilacrilamida (NIPAM), metacrilato de metilo (MMA), acrilato de butilo, acrilato de *terc*-butilo o ácido 4-(acriloilamido)benzoico (4-ABZ) y la unidad monomérica que tiene al menos un grupo aniónico
 - 10 está seleccionada entre ácido 2-acrilamido-2-metilpropano (AMPS), ácido vinilsulfónico (VS), ácido estiren sulfónico o ácido (met)acrílico, con la muestra de manera que se forma un precipitado de copolímero-molécula diana
 - c) separar el precipitado de la mezcla de la etapa b) de modo que en la etapa a) el pH de la muestra se ajusta a un pH por debajo del punto isoeléctrico de la molécula diana.
- 15 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que de un 35 a un 65 % de los grupos aniónicos e hidrófobos del copolímero son grupos aniónicos.
3. Método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 2, de manera que la unidad monomérica que tiene al menos un grupo aniónico es ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico (AMPS) y la unidad monomérica que tiene al menos un grupo hidrófobo está seleccionada entre bencilacrilamida (BzAAM) o ácido 4-(acriloilamido)benzoico (4-ABZ).
- 20 4. Método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 3, de manera que el copolímero tiene un peso molecular promedio expresado en peso entre 10.000 y 120.000 g/mol y/o una polidispersidad entre 1,05-2,5.
5. Método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4, de manera que la molécula diana es un anticuerpo.
- 25 6. Método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 5, de manera que en la etapa a) el pH de la muestra se ajusta a un valor entre 4 y 5,5.
7. Método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 6, de manera que la fuerza iónica de la muestra se ajusta para que sea igual a una conductividad de 17 mS/cm o menos, medida a 20 °C.
8. Método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4, de manera que la molécula diana es una región de unión a antígeno de fragmento.
- 30 9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, de manera que la fuerza iónica de la muestra se ajusta para que sea igual a una conductividad entre 9 y 18 mS/cm, medida a 20 °C.
10. Método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 9, de manera que en una etapa d) adicional, el precipitado de la etapa c) se re-disuelve.
- 35 11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, de manera que la mezcla re-disuelta de la etapa d) se trata con perlas que portan polielectrolitos.
12. Método de acuerdo con la reivindicación 11, de manera que las perlas que portan polielectrolitos son escamas de vidrio o sílice.
13. Método de acuerdo con la reivindicación 12 y 13, de manera que los polielectrolitos comprenden grupos DMAE y/o TMAE.

Fig. 1



Copolímtero AMPS-ABZ



Copolímtero AMPS-BzAAm

Fig. 2

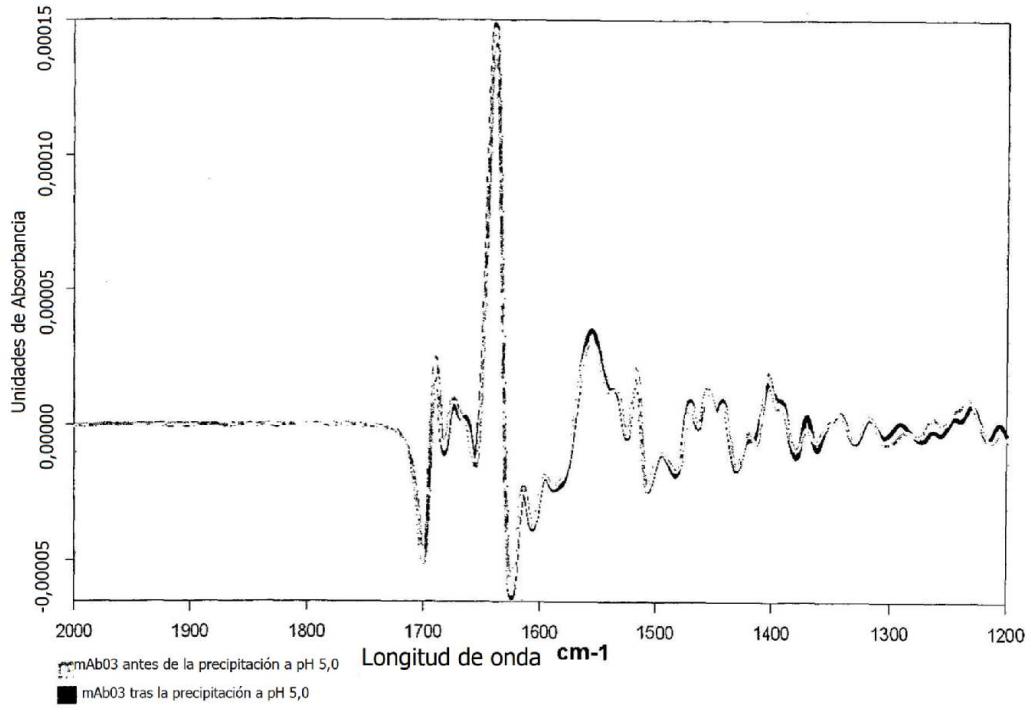


Fig. 3

