

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 078**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/22** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2014 PCT/US2014/043095**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015 WO15034566**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2014 E 14737471 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3041857**

54 Título: **Cromatografía de Proteína A**

30 Prioridad:  
**04.09.2013 US 201361873450 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.01.2020**

73 Titular/es:  
**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)  
400 Summit Drive  
Burlington, MA 01803, US**

72 Inventor/es:  
**BIAN, NANYING;  
MEHTANI, SAPNA y  
HUBBARD, JOHN DANA**

74 Agente/Representante:  
**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 737 078 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

## Cromatografía de Proteína A

## Campo de la invención

5 La presente invención proporciona métodos para limpiar una columna de cromatografía de proteína A. Además, se refiere a métodos para limpiar una columna de cromatografía de afinidad basada en Proteína A que emplea un medio de cromatografía de afinidad que contiene un ligando basado en el dominio C de la Proteína *Staphylococcus aureus*.

## Antecedentes de la invención

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII. Dicha copia ASCII, creada el 3 de junio de 2014, se llama P13-136PCT SL.txt y tiene un tamaño de 6.289 bytes.

10 Los procesos convencionales para la purificación de proteínas típicamente implican métodos de cultivo celular, p. ej., utilizando líneas celulares de mamíferos o bacterias diseñadas de forma recombinante para producir la proteína de interés seguida de: (a) una etapa de clarificación para la eliminación de células y desechos celulares, p. ej., usando centrifugación y/o filtración diferencial; y (b) una o más etapas de cromatografía corriente abajo para separar la proteína de interés de diversas impurezas en la alimentación del cultivo celular clarificado.

15 En el caso de anticuerpos monoclonales y otras proteínas que contienen Fc, el estándar industrial para la purificación típicamente implica un proceso multi-etapa. Una de las etapas importantes es una etapa de purificación que emplea un ligando de afinidad llamado Proteína A, que se une a la región Fc de los anticuerpos. Típicamente, en esta etapa se elimina un gran porcentaje de impurezas. Aunque la cromatografía de afinidad de Proteína A es una etapa muy efectiva durante la purificación de anticuerpos, una desventaja de usar la Proteína A es que es muy cara en comparación con las resinas de intercambio iónico. El posterior empaquetado y desempaquetado de las columnas de cromatografía de afinidad también requiere mucha mano de obra y conlleva un coste de almacenamiento significativo. Por lo tanto, es deseable poder limpiar, reutilizar y desinfectar la columna de Proteína A durante varios ciclos.

20 Actualmente, las columnas de cromatografía que emplean la mayoría de los medios de Proteína A disponibles en el mercado se limpian utilizando condiciones alcalinas o condiciones ácidas. Por ejemplo, las columnas de cromatografía que emplean medios MabSelect Sure® (GE), KanCap A (Kaneka) y ToyoPearl® AF-rProtein A 650F (Tosoh) se limpian con una disolución alcalina tal como hidróxido de sodio, mientras que las columnas de cromatografía que emplean un medio ProSep® Ultra Plus (EMI) Millipore Corporation) utilizan una disolución ácida para la limpieza.

## Compendio de la invención

30 La presente invención, como se define en las reivindicaciones, proporciona métodos para limpiar una columna de cromatografía que emplea un medio que contiene un ligando basado en el dominio C de la Proteína A de *Staphylococcus aureus* inmovilizada sobre un soporte sólido, donde la columna se puede limpiar utilizando tanto disoluciones ácidas como alcalinas.

35 Como se ha discutido anteriormente, las columnas de cromatografía que emplean la mayoría de los medios de Proteína A disponibles en el mercado se pueden limpiar utilizando una disolución ácida o una disolución alcalina debido a la inestabilidad del ligando de la Proteína A o de la matriz de base a una exposición prolongada a una disolución ácida o alcalina. Un proceso de purificación que emplea tal columna de cromatografía se configura en consecuencia, para permitir la limpieza solo en condiciones alcalinas o la limpieza solo en condiciones ácidas.

40 Los métodos de acuerdo con la presente invención permiten que una columna de cromatografía que emplea un medio que comprende un ligando basado en el dominio C de la Proteína A inmovilizada sobre un soporte sólido, sea limpiada en condiciones ácidas, además de o como alternativa a la limpieza en condiciones alcalinas, proporcionando así una mayor flexibilidad en la operación. Al permitir una limpieza eficiente de las columnas de cromatografía que emplean tales medios, los métodos descritos en este documento pueden conservar la capacidad de unión de la columna durante numerosos ciclos. Además, al permitir la limpieza de una columna de cromatografía que emplea tal medio, se logra una mayor eliminación de impurezas en comparación con el uso de condiciones alcalinas o condiciones ácidas solo para la limpieza, lo que da como resultado una mayor pureza del producto.

45 En algunas realizaciones, se proporciona un método para conservar la capacidad de unión de una columna de cromatografía de afinidad durante uno o más ciclos de purificación por afinidad, comprendiendo el método limpiar la columna de cromatografía después de uno o más ciclos de purificación por afinidad con una disolución ácida que tiene un pH inferior a 3,0, en donde la columna de cromatografía de afinidad comprende un medio que comprende un ligando de Proteína A derivado del dominio C de la Proteína A de *Staphylococcus aureus* inmovilizada sobre un soporte sólido que comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en poliviniléter, alcohol de polivinilo, polimetacrilato, poliacrilato, poliestireno, poliacrilamida, polimetacrilamida y policarbonato.

En algunas otras realizaciones, se proporciona un método para limpiar una columna de cromatografía de afinidad que usa disoluciones tanto ácidas como alcalinas, donde el método comprende: (a) poner en contacto la columna con

disoluciones tanto ácidas como alcalinas después de un ciclo; o (b) poner en contacto la columna con una disolución ácida después de un ciclo o una disolución alcalina después de un ciclo, de manera que las disoluciones ácidas y alcalinas se usen de manera alterna, en donde la columna de cromatografía de afinidad comprende un medio que comprende un ligando de proteína A derivado del dominio C de la proteína A de *Staphylococcus aureus* inmovilizada sobre un soporte sólido.

En algunas realizaciones, el ligando de Proteína A comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4.

En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en poliviniléter, alcohol polivinílico, polimetacrilato, poliacrilato, poliestireno, poliacrilamida, polimetacrilamida y policarbonato. En una realización particular, el soporte sólido comprende un polímero de poliviniléter.

En algunas realizaciones, la disolución ácida tiene un pH de 1,5 o un pH de 2,0 o un pH de 2,5.

En algunas realizaciones, la capacidad de unión se conserva durante 10 o más ciclos. En otras realizaciones, la capacidad de unión se conserva durante 50 o más ciclos. En otras realizaciones más, la capacidad de unión se conserva durante 100 o más ciclos. En otras realizaciones más, la capacidad de unión se conserva durante 200 o más ciclos.

En el presente documento también se proporciona un método para desinfectar una columna de cromatografía de afinidad después de su uso mientras se mantiene la capacidad de unión de la columna, donde el método comprende poner en contacto la columna de cromatografía de afinidad con una disolución que comprende ácido fosfórico, ácido acético y alcohol bencílico durante al menos tres horas, y en donde la columna de cromatografía de afinidad comprende un ligando de Proteína A derivado del dominio C de la Proteína A de *Staphylococcus aureus* inmovilizada sobre un soporte sólido seleccionado del grupo que consiste en poliviniléter, alcohol polivinílico, polimetacrilato, poliacrilato, poliestireno, poliacrilamida, polimetacrilamida y policarbonato.

#### Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra los resultados de un experimento para medir el porcentaje de capacidad de unión estática retenida de las resinas A, B y C tras la exposición a: (1) ácido clorhídrico al 0,3%, pH 1,5; (2) ácido fosfórico 0,15 M, pH 1,5; (3) NaOH 0,1 M; y (4) NaOH 0,5 M, durante 25 horas, lo que equivale a 100 ciclos (a 15 min/ciclo). Las tres muestras de resina demuestran una retención de más del 95% de la capacidad de unión tras exposición a HCl al 0,3% y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,15 M después de 25 horas de exposición con relación al control. Las resinas A y B retienen más del 95% de la capacidad de unión tras exposición a NaOH 0,1 M con relación al control. Las resinas A y B retienen aproximadamente el 75% de la capacidad de unión tras exposición a NaOH 0,5 M con relación al control. La resina C retiene aproximadamente el 65% de la capacidad de unión tras exposición a NaOH 0,1 M con relación al control. La resina C retiene aproximadamente el 38% de la capacidad de unión tras exposición a NaOH 0,5 M con relación al control. La desviación estándar es de aproximadamente 3%.

La Figura 2 es un gráfico de barras representando los resultados de un experimento para medir el porcentaje de capacidad de unión dinámica retenida (10% a un tiempo de residencia de 4 min) después de 100 y 200 ciclos de exposición de la resina B a: (1) limpieza alternando NaOH 0,1 M y ácido fosfórico 0,15 M, pH 1,5, cada 10 ciclos; (2) limpieza con limpieza solo con ácido fosfórico; y (3) limpieza con disolución alcalina de NaOH 0,1 M solamente. No se observaron cambios significativos en la capacidad de unión dinámica (10% de avance) después de 200 ciclos (a 15 min/ciclo) con exposición alterna de ácido fosfórico y NaOH y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,15M; después de 200 ciclos (a 15 min/ciclo), la exposición a H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,15 M solo, o después de 200 ciclos (15 min/ciclo), exposición a NaOH 0,1 M. La desviación estándar es de aproximadamente 10%.

#### Descripción Detallada de la Invención

La cromatografía de afinidad de la proteína A implica la unión de una proteína que contiene Fe (*p. ej.*, una inmunoglobulina u otra proteína de fusión Fc) a una resina o medio de Proteína A (*i.e.*, un ligando de Proteína A inmovilizada en un soporte sólido) empaquetada en la columna y posterior elución de la proteína que contiene Fc de la columna. La limpieza in situ (CIP, por sus siglas en inglés) es crucial para el uso eficiente de una columna de cromatografía y para maximizar el número de ciclos que se puede reutilizar una columna. Generalmente se requiere un procedimiento de limpieza que elimine las impurezas de manera eficiente sin ser perjudicial para la resina de cromatografía. Una de las soluciones de limpieza más comunes que se utilizan típicamente para limpiar y desinfectar la mayoría de las resinas de Proteína A disponibles comercialmente es el hidróxido de sodio (NaOH) (véase, *p. ej.*, Hagel L. et al. Handbook of Process Chromatography-Development, Manufacturing, Validation and Economics. Segunda edición. Londres, UK: Academic Press; 2008. Cleaning and Sanitization; pp. 147-159; Gronberg et al., MAbs. 2011 marzo-abril; 3(2): 192-202). Típicamente, cuando se realizan numerosos ciclos subsiguientes en el modo columna, puede haber una acumulación gradual de contaminantes en la resina de cromatografía, causando ensuciamiento de la columna y una eficiencia y capacidad de unión reducidas de la columna. Un procedimiento de limpieza eficiente entre ciclos minimiza la acumulación de contaminantes en la columna de cromatografía, prolongando así la vida de la columna. Esto también se conoce como regeneración de columna.

Mientras que la mayoría de las resinas de Proteína A disponibles en el mercado se limpian con una disolución alcalina como el hidróxido de sodio, la resina ProSep® Ultra Plus (EMD Millipore Corporation) se limpia con ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).

5 La presente invención se basa, al menos en el sorprendente e inesperado descubrimiento de que una columna de cromatografía que emplea un medio que contiene un ligando basado en el dominio C de la proteína A de *Staphylococcus aureus* inmovilizada sobre un soporte sólido se puede limpiar con disoluciones tanto ácidas como alcalinas. Al permitir la limpieza de una columna con disoluciones tanto ácidas como alcalinas, no solo se logra una mayor flexibilidad en la operación, sino también cuando se usan disoluciones tanto alcalinas como ácidas para la limpieza durante un proceso de purificación, se logra una mayor pureza de proteínas.

10 Para que la presente divulgación se entienda más fácilmente, primero se definen algunos términos. Las definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

#### Definiciones

15 Como se usa en el presente documento, el término "SpA", "Proteína A" o "Proteína A de *Staphylococcus aureus*" se refiere a una proteína multidominio de 42 kDa aislada de la bacteria *Staphylococcus aureus*. SpA se une a la pared celular bacteriana a través de su región de unión de la pared celular carboxiterminal, conocida como el dominio X. En la región amino-terminal, incluye cinco dominios de unión a inmunoglobulina, denominados E, D, A, B y C (Sjodhal, Eur J Biochem. Sep 78(2):471-90 (1977); Uhlen et al., J Biol Chem. Feb 259(3):1695-702 (1984)). Cada uno de estos dominios contiene aproximadamente 58 restos de aminoácidos, y comparten 65-90% de identidad de secuencia de aminoácidos.

20 Cada uno de los dominios E, D, A, B y C de SpA posee distintos sitios de unión a Ig. Un sitio es para Fe (la región constante de la clase de IgG de Ig) y el otro es para la porción Fab de ciertas moléculas de Ig (la porción de la Ig que es responsable del reconocimiento de antígenos). Se ha informado que cada uno de los dominios contiene un sitio de unión a Fab. La porción de no unión a Ig de SpA se encuentra en el extremo C y se designa la región X o el dominio X.

25 Como se usa indistintamente en el presente documento, los términos "dominio C", "dominio C de SpA", "dominio C de la proteína A" y "dominio C de la Proteína A de *Staphylococcus aureus* A" se refieren al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se establece en la SEQ ID NO: 1 o la codificada por, p. ej., la secuencia de nucleótidos establecida en la SeQ ID NO:2. El "dominio C" es un polipéptido de 58 aminoácidos que se pliega en una estructura de mango de triple hélice. Es capaz de unirse al Fe a través de los restos sobre la superficie de las hélices 1 y 2, o a Fah a través de los restos sobre la superficie de las hélices 2 y 3.

30 Los ligandos de la proteína A basados en el dominio C de la proteína A, como se usan en los métodos descritos en este documento, incluyen ligandos que tienen una secuencia de aminoácidos al menos el 80%, o al menos el 85%, o al menos el 90%, o al menos el 95%, o más idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1.

En diversas realizaciones, un ligando de proteína A basado en el dominio C de la Proteína A usado en los métodos descritos en este documento comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3 o la SEQ ID NO:4.

35 El término "cromatografía", como se usa en el presente documento, se refiere a una técnica de separación dinámica que separa una molécula diana tal como una proteína diana (p. ej., una inmunoglobulina u otra proteína que contiene Fc) de otras moléculas en la mezcla y permite aislarla. Típicamente, en un método de cromatografía, una fase móvil (líquido o gas) transporta una muestra que contiene la molécula diana de interés a través o por medio de un medio de fase estacionaria (normalmente sólido). Las diferencias en la partición o afinidad a la fase estacionaria causan la unión temporal de moléculas seleccionadas a la fase estacionaria mientras que la fase móvil transporta diferentes moléculas en diferentes momentos,

40 El término "cromatografía de afinidad", como se usa en el presente documento, se refiere a un modo de cromatografía donde una molécula diana, tal como una molécula de proteína (p. ej., una proteína que contiene Fc) que se va a separar se aísla mediante su interacción llave-cerradura con una molécula (p. ej., un ligando a base de proteína A) inmovilizada en la resina de cromatografía. Esta interacción específica permite a la molécula diana unirse mientras que las moléculas indeseables fluyen a través. Al cambiar la temperatura, pH, fuerza iónica de la fase móvil se libera la molécula diana con pureza elevada. En diversas realizaciones descritas en este documento, la cromatografía de afinidad implica la adición de una muestra que contiene una molécula diana (p. ej., una inmunoglobulina u otra proteína que contiene Fe) a un soporte sólido que lleva un ligando basado en el dominio C de la Proteína A (referida como medio o resina de cromatografía de afinidad de Proteína A).

45 El término "cromatografía de afinidad de la proteína A", como se usa en el presente documento, se refiere a la separación o el aislamiento de sustancias que utilizan la Proteína A o ligandos basados en SpA basados en el dominio C de la Proteína A, como los descritos en el presente documento, donde el ligando de SpA o de Proteína A se inmoviliza sobre un soporte sólido.

55 El término "ligando" como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula biológica basada en el dominio C de la Proteína A que está inmovilizada sobre un soporte sólido (p. ej., una superficie porosa) y que es capaz de

unirse a una proteína que contiene Fc. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el ligando comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3, o variantes, fragmentos o derivados de la misma. En algunas otras realizaciones descritas en el presente documento, el ligando comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:4, o variantes, fragmentos o derivados de la misma.

5 El término "soporte sólido" se refiere en general a cualquier material (poroso o no poroso) al que está unido un ligando. La unión de ligandos al soporte sólido puede ser a través de un enlace covalente, como en el caso de injertos (a través de éter, tioéter, enlace carbono-carbono u otras uniones), o mediante recubrimiento, adhesión, adsorción y mecanismos similares. Los ejemplos de soportes sólidos usados en los métodos descritos en el presente documento incluyen poliviniléter, alcohol polivinílico, polimetacrilato, poliacrilato, poliestireno, poliacrilamida, polimetacrilamida y policarbonato.

10 Los ejemplos de medio/resina de cromatografía de afinidad de Proteína A conocidos en la técnica incluyen aquellos que tienen la Proteína A inmovilizada sobre un esqueleto de vidrio de poro controlado, p. ej., medio/resina PROSEP® A y PROSEP® vA (EMD MILLIPORE); los que tienen Proteína A inmovilizada sobre una fase sólida de poliestireno, p. ej., medio/resina POROS® 50A y POROS® MabCapture™ A (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.), y los que tienen Proteína A inmovilizada sobre un soporte sólido de agarosa, p. ej., medios o resinas rPROTEIN A SEPHAROSE FAST FLOW™ o MABSELECT™ (GE HEALTHCARE). En diversas realizaciones, los ligandos de Proteína A empleados en los métodos descritos en este documento se inmovilizan sobre un soporte sólido seleccionado del grupo que consiste en poliviniléter, alcohol polivinílico, polimetacrilato, poliacrilato, poliestireno, poliacrilamida, polimetacrilamida y policarbonato.

20 En una realización particular, los ligandos utilizados en los métodos descritos en este documento se inmovilizan sobre un polímero de poliviniléter. Véase, p. ej., Patente de EE.UU. No. 7,951,885.

25 El término "resina de afinidad" o "resina de cromatografía de afinidad" o "medio de afinidad" o "medio de cromatografía de afinidad, como se usa indistintamente en este documento, se refiere a un ligando de cromatografía de afinidad (p. ej., basado en el dominio C de la Proteína A) unido a un soporte sólido tal como, p. ej., los descritos en el presente documento. En general, los términos "resina" y "medio" se usan indistintamente en este documento.

El término "proteína diana" o "proteína de interés", como se usa indistintamente en el presente documento, se refiere a cualquier proteína que pueda purificarse utilizando el dominio C de la Proteína A, o una variante o derivado de la misma. En diversas realizaciones, la proteína diana es una proteína que contiene Fc tal como, p. ej., una inmunoglobulina o una proteína de fusión Fc.

30 El término "inmunoglobulina", "Ig" o "anticuerpo" (utilizado indistintamente en el presente documento) se refiere a una proteína que tiene una estructura básica de cadena de cuatro polipéptidos que consiste en dos cadenas pesadas y dos ligeras, siendo estabilizadas dichas cadenas, por ejemplo, por enlaces disulfuro intercatenario que tienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno. El término "inmunoglobulina de cadena única" o "anticuerpo de cadena única" (utilizado indistintamente en el presente documento) se refiere a una proteína que tiene una estructura de cadena de dos polipéptidos que consiste en una cadena pesada y una cadena ligera, estando estabilizadas dichas cadenas, por ejemplo, por ligantes de péptido intercadena, que tienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno. El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena pesada o ligera que comprende bucles peptídicos (p. ej., que comprenden 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, mediante una hoja  $\beta$  plegada y/o un enlace disulfuro intracadena. Los dominios se mencionan adicionalmente en el presente documento como "constante" o "variable", en función de la falta relativa de variación de secuencia dentro de los dominios de diversos miembros de la clase en el caso de un dominio "constante", o la variación significativa dentro de los dominios de diversos miembros de la clase en el caso de un dominio "variable". Los "dominios" de anticuerpos o polipéptidos a menudo se denominan indistintamente en la técnica como "regiones" de anticuerpos o polipéptidos. Los dominios "constantes" de las cadenas ligeras de anticuerpos se denominan indistintamente como "regiones constantes de cadena ligera", "dominios constantes de cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" de las cadenas pesadas de anticuerpos se denominan indistintamente como "regiones constantes de cadena pesada", "dominios constantes de cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH". Los dominios "variables" de las cadenas ligeras de anticuerpos se denominan indistintamente como "regiones variables de cadena ligera", "dominios variables de cadena de visión", regiones "VL" o dominios "VL". Los dominios "variables" de las cadenas pesadas de anticuerpos se denominan indistintamente como "regiones variables de la cadena pesada", "dominios variables de la cadena pesada", regiones "VH" o dominios "VH".

35 Las inmunoglobulinas o 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. El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos restos de aminoácidos que un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos pueden obtenerse a través de tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpos intacto o completo. Los fragmentos también se pueden obtener por medios recombinantes. Los fragmentos ilustrativos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc y/o Fv.

Los métodos de la invención pueden usarse durante la purificación de cualquier anticuerpo o fragmento del mismo

que pueda unirse a la Proteína A incluidos, entre otros, pero no limitados a, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se utilizan durante la purificación de anticuerpos terapéuticos.

5 Los anticuerpos terapéuticos ilustrativos incluyen Herceptin™; Rituxan™; Avastin™; Bexxar™; Campath™; Erhitux™; Humira™; Raptiva™; Remicade™; ReoPro™; Prolia®; Xgeva®; Simnlect™; Synagls™; Xolair™; Zenapax™; Mylotarg™; y Vectibix™. Las proteínas de fusión Fc ilustrativas incluyen la fusión a formas solubles de receptores o enzimas y variantes, derivados o análogos de las mismas, tales como, p. ej., ENBREL®.

10 Se entiende que la proteína diana purificada utilizando los métodos descritos en este documento es una que contiene una región Fc y, por lo tanto, es susceptible de purificación por la Proteína A. El término "región Fc" o "Fc", como se usa en este documento, se refiere a aquellos restos de aminoácidos de una molécula de inmunoglobulina que interactúan con la Proteína A. La región Fc es la región de la cola cristalizable de un anticuerpo e interactúa con los receptores de la superficie celular llamados receptores Fc.

15 El término "unión a Fc," "se une a una porción de Fc" o «que se une a una porción de Fc" se refiere a la capacidad de un ligando de afinidad descrito en este documento para unirse a la parte constante (Fc) de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un ligando de acuerdo con la presente invención se une a una porción Fc de un anticuerpo (p. ej., IgG1, IgG2 o IgG4 humana) con una afinidad de al menos  $10^{-7}$  M, o al menos  $10^{-8}$  M, o al menos  $10^{-9}$  m.

20 Como se usa en el presente documento, el término "fragmento(s)" se refiere a una porción de una proteína que contiene Fc de longitud completa tal como, p. ej., una inmunoglobulina. Los ejemplos de fragmentos incluyen fragmentos Fab, moléculas de anticuerpos de cadena única, diacuerpos, anticuerpos lineales y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

25 Las inmunoglobulinas y otras proteínas que contienen Fc que se purifican utilizando los métodos descritos en este documento pueden expresarse utilizando cualquier sistema de expresión o tipo de célula adecuado. En algunas realizaciones, una inmunoglobulina u otra proteína que contiene Fc se expresa en una célula de mamífero, p. ej., células CHO o NS0, hibridomas, células de ratón, etc. En otra realización, una inmunoglobulina u otra proteína que contiene Fc se expresa utilizando un cultivo celular no de mamífero (p. ej., células de insecto, células de levadura, *Escherichia coli*, etc.). Después de la expresión en un cultivo celular, las especies insolubles se eliminan típicamente usando un método de clarificación tal como, p. ej., filtración profunda, centrifugación, floculación/precipitación (p. ej., precipitación ácida o polímero sensible a estímulos). Este cultivo celular clarificado se carga típicamente en una columna de Proteína A para separar la inmunoglobulina o la proteína que contiene Fc de las impurezas solubles, como las proteínas de la célula huésped, ADN, virus u otras impurezas.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "polipéptido purificado" o "proteína purificada" es un producto eluido de una etapa de afinidad de la Proteína A que utiliza el gradiente de pH o los métodos de la etapa de pH como se describe en este documento. Los polipéptidos/proteínas purificados preferiblemente contienen principalmente monómeros polipeptídicos.

35 Como se usa en este documento, el término "polipéptido no purificado", "proteína no purificada" o "carga de proteína" es un polipéptido o proteína en el material de carga o material de partida antes de la etapa de purificación por afinidad de la Proteína A,

40 Como se usa en el presente documento, el término "pureza de una proteína que contiene Fc" se define como la especie monomérica de la proteína diana (es decir, una proteína que contiene Fc) en relación con la proteína total separada por elución de una columna de cromatografía de Proteína A después de una proceso de purificación, que emplea un procedimiento de limpieza descrito en este documento. Por consiguiente, la pureza se puede calcular por la relación de monómero total a la proteína total en el conjunto de elución final. La proteína total puede contener uno o más fragmentos de proteínas, agregados, especies monoméricas de la proteína diana y sus variantes.

45 Como se usa en el presente documento, el término "limpieza" se refiere a una etapa durante el proceso de purificación de una proteína diana (p. ej., una inmunoglobulina u otra proteína que contiene Fc) que implica eliminar niveles trazas de impurezas que quedan en una columna de cromatografía de afinidad, p. ej., una columna de Proteína A, para conservar el rendimiento y la integridad de la columna. Aunque la etapa de la limpieza elimina impurezas de la columna, idealmente debería tener un impacto mínimo en el rendimiento de la columna, según se mide utilizando la capacidad de unión (la cantidad de proteína diana que la columna puede purificar) y/o la resolución (la capacidad del medio o resina en la columna para separar la proteína diana de las entidades indeseables). La mayoría de las columnas de cromatografía de afinidad disponibles en el mercado, p. ej., que emplean la proteína A de *Staphylococcus* o un derivado de la misma) se limpian utilizando una disolución ácida o una disolución alcalina. Por ejemplo, la columna de proteína A MabSelect SuRe® se limpia con NaOH diluido. Por otro lado, la columna de Proteína A Prosep® generalmente se limpia usando ácido fosfórico. Sin embargo, la mayoría de las resinas de Proteína A actualmente disponibles en el mercado son inestables en condiciones extremas de pH y por lo tanto no se pueden limpiar con condiciones tanto ácidas como alcalinas.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término "limpieza in situ" o "CIP" es un método para limpiar las superficies interiores de tuberías, recipientes, equipos de proceso, filtros y accesorios asociados, sin desensamblar.

El beneficio de usar CIP es que la limpieza es más rápida, requiere menos mano de obra y es más repetible, y representa un riesgo menor de exposición química para las personas. Para una columna de cromatografía, CIP se refiere a la limpieza del material de resina, así como al cuerpo de la columna y los accesorios finales sin desensamblar la columna. Por lo general, una columna de cromatografía limpiada después de una operación se vuelve a equilibrar de inmediato para la siguiente operación o se desinfecta para un almacenamiento a corto o largo plazo.

Como se usa en el presente documento, el término "ciclo" o "ciclo de afinidad" o "ciclo de purificación de cromatografía de afinidad de Proteína A" se refiere a un proceso multi-etapa que comienza con el equilibrado de la columna de cromatografía que emplea una resina basada en Proteína A, con un tampón neutro; seguido de la carga de una alimentación de cultivo celular clarificada en la columna, donde la alimentación de cultivo celular clarificada contiene la proteína que contiene Fc que se va a purificar (p. ej., un anticuerpo monoclonal); seguido del lavado de la columna con uno a tres tampones diferentes para eliminar las impurezas unidas ligeramente, lo que no interfiere con la unión de la proteína que contiene Fc a la resina de Proteína A; seguido de elución de la proteína que contiene Fc de la columna de Proteína A utilizando un tampón de elución (p. ej., que tiene un pH de 2,5-4). Este proceso multi-etapa de equilibrio, carga, lavado y elución constituye un ciclo o un ciclo de unión y elución. Un ciclo suele ir seguido de una etapa de limpieza para eliminar niveles traza de impurezas en la columna antes del siguiente ciclo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "campaña" se refiere a varias rondas de procesos o ciclos de purificación individuales, ejecutados uno tras otro para producir una cantidad deseada de material dentro de un período de tiempo específico. En el caso de la purificación de proteínas que contienen Fc, incluidos los anticuerpos monoclonales, una campaña generalmente implica varias ejecuciones de biorreactores junto con las etapas de purificación posteriores para proporcionar una cantidad establecida de la proteína que se va a purificar para el rellenado final. Aunque la limpieza se practica rutinariamente entre ejecuciones dentro de la campaña, cuando se completa una campaña, las columnas de cromatografía, incluidas las columnas de cromatografía que emplean ligandos basados en Proteína A, se desinfectan adicionalmente para su almacenamiento, ya que las columnas se utilizan típicamente de nuevo en la próxima campaña, lo que podría ser varios días o semanas o meses después.

Tal como se usa en el presente documento, el término "desinfección" o «desinfectando» o «desinfectar» es la etapa usada después de completar una campaña y está diseñada para reducir la población microbiana a un nivel considerado seguro o aceptable, según lo determine la FDA u otras agencias regulatorias. La desinfección se logra típicamente utilizando calor o productos químicos. Una columna de cromatografía que se va a almacenar hasta la próxima campaña generalmente se desinfecta por medios químicos debido a la impracticabilidad de la desinfección por calor. La mayoría de las columnas de cromatografía de afinidad, incluidas las que emplean ligandos de proteína A más disponibles en el mercado, se desinfectan utilizando NaOH hasta 0,5M. Sin embargo, también se sabe que el NaOH 0,5 M disminuye significativamente el rendimiento de las resinas de cromatografía de afinidad de Proteína A debido al efecto de desamidación de NaOH en el ligando de la Proteína A. En algunas realizaciones descritas en este documento, una disolución que comprende ácido fosfórico, ácido acético y alcohol bencílico (PAB) se usa para la desinfección. Aunque anteriormente se ha mostrado que el PAB (ácido fosfórico 120 mM, ácido acético 167 mM, alcohol bencílico al 2,2%) se puede usar como desinfectante en el caso de la familia ProSep® de medios de afinidad de Proteína A, no se considera adecuado para todos los medios de proteína A, en especial los medios que generalmente se limpian o desinfectan en condiciones alcalinas. Véase, M. Rogers et al., J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4589-4596.

El término "densidad de carga" o "densidad que se carga" es la cantidad de muestra que contiene una inmunoglobulina u otra proteína que contiene Fc cargada en una columna de cromatografía por volumen de medio de cromatografía. La densidad de carga se mide en g/L. En algunas realizaciones, la muestra se carga con una densidad de carga de 5 g/L, o 10 g/L, o 12 g/L, o 15g/L, o 20g/L, o 30 g/L, o 40 g/L o mayor.

Un "tampón" es una disolución que resiste los cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. Diversos tampones que se pueden emplear dependiendo, por ejemplo, del pH deseado del tampón se describen en Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., Ed. Calbiochen Corporation (1975).

El "tampón de equilibrio" en este documento es el usado para preparar el soporte sólido (con proteína A inmovilizada) para cargar la proteína diana.

El "tampón de lavado" se usa en el presente documento para referirse al tampón que se hace pasar sobre el soporte sólido (con proteína A inmovilizada) después de la carga y antes de la elución de la proteína diana.

El término "capacidad de unión" se refiere a la cantidad de una molécula que se unirá a un volumen definido de resina o medio empaquetado en una columna que se ejecuta en condiciones definidas. La capacidad de unión se puede medir como capacidad de unión estática o capacidad de unión dinámica, en caso de capacidad de unión estática, se determina la cantidad de una molécula que se une a un volumen definido de resina cuando la molécula y la resina están en contacto durante una cantidad de tiempo infinita. La capacidad de unión estática mide la cantidad más elevada de una molécula diana que una resina puede unir. En la práctica, el valor a menudo se obtiene poniendo en contacto el exceso de la molécula diana con la resina durante 4 horas o más con un flujo mínimo o sin flujo. La capacidad de unión dinámica, por otro lado, es la cantidad de una molécula diana que la resina puede unir por volumen de resina a un caudal establecido. La capacidad de unión dinámico para cualquier resina depende en gran medida de

las condiciones subyacentes. En general, cuanto más bajos sean los caudales, mayor será la capacidad de unión dinámica. A medida que el caudal se acerca a cero, la capacidad de unión se acerca a la capacidad máxima disponible - capacidad de unión estática. Sin una limpieza y desinfección adecuadas, la capacidad de unión de una resina de Proteína A generalmente cae por debajo del valor inicial después de múltiples ciclos de unión y elución. Cuando la capacidad de unión es inferior a un cierto valor que se fija durante un desarrollo de un método/proceso de cromatografía, una cantidad significativa de la proteína diana podría «avanzar» o co-eluirse con el flujo a través de la fracción que contiene impurezas, conduciendo a la pérdida del producto. La limpieza adecuada usando productos químicos adecuados puede mantener la capacidad de unión de la resina durante un período prolongado de tiempo. Esto se logra típicamente utilizando una disolución alcalina, como NaOH 0,1 M, o una disolución ácida, como H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,15M, en base a las condiciones establecidas para las diferentes resinas disponibles comercialmente. Sin embargo, en el caso de los métodos descritos en el presente documento, se pueden usar disoluciones tanto ácidas como alcalinas para limpiar, mientras se conserva la capacidad de unión de la resina.

#### Cromatografía de Proteína A

La cromatografía de Proteína A es una forma de cromatografía de afinidad, la más comúnmente utilizada para la purificación de proteínas que contienen Fe como, p. ej., inmunoglobulinas o anticuerpos. En general, una proteína diana (p. ej., una inmunoglobulina u otra proteína que contiene Fe) se expresa en un cultivo celular adecuado y la alimentación del cultivo celular se somete a clarificación, antes de cargar el alimento clarificado en un medio de cromatografía de Proteína A, p. ej., empaquetado en una columna de cromatografía,

La cromatografía de Proteína A generalmente emplea un soporte sólido tal como, p. ej., una perla porosa o una resina, que tiene un ligando de proteína A adecuado inmovilizado sobre la misma. El soporte sólido unido a la Proteína A a continuación se empaqueta en una columna de cromatografía. La columna se puede equilibrar primero con un tampón para equilibrar adecuado. Esto generalmente se logra haciendo fluir de 3 a 10 volúmenes de columna (CV) de un tampón de pH neutro, como un tampón de disolución salina fosfato o un tampón Tris, a un pH de 7-7,5, a través de la resina de proteína A. La alimentación clarificada que contiene la proteína diana se pone en contacto a continuación con el soporte sólido en la columna cargando la columna con una muestra que contiene la proteína diana (p. ej., una alimentación de cultivo celular clarificado que contiene la proteína diana). La cantidad de alimentación cargada clarificada se determina por la concentración de la proteína que contiene Fe en el alimento (título) y la capacidad de unión de la proteína que contiene Fe a la resina de Proteína A a un caudal establecido. Típicamente, las impurezas solubles, como proteínas de la célula huésped y ADN, no se unen a la Proteína A y, por lo tanto, se eliminan en el flujo continuo y se desvían a los residuos. Una vez que se completa la carga, la columna a menudo se lava con uno a tres tampones diferentes para eliminar las impurezas unidas, lo que no interfiere con la unión de la proteína diana a la resina de la Proteína A. Esta etapa también se conoce como etapa de lavado intermedia. Mejora adicionalmente la pureza de la proteína objetivo cuando posteriormente se eluye de la columna de Proteína A utilizando un tampón de elución (p. ej., teniendo un pH de 2,5-4,5). Los tampones de elución comunes son ácido acético y ácido cítrico, pH 2,5-4,5. Los caudales típicos para el intervalo de elución van desde 60 volúmenes de columna (CV) por hora a 5 CV por hora. En caso de elución en gradiente, la elución típica se realiza en volúmenes de 5 a 60 columnas. En algunas realizaciones, se mezclan un tampón de pH alto y un tampón de pH bajo para generar un gradiente de pH que varía de pH 7,0 a 3,0. En algunas realizaciones, el gradiente de pH comienza a 7,0, o aproximadamente 6,8, o aproximadamente 6,6, o aproximadamente 6,4, o aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,0, aproximadamente 5,8, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,2 o aproximadamente 5,0 o aproximadamente 4,8 o aproximadamente 4,6, o aproximadamente 4,4, o aproximadamente 4,2, o aproximadamente 4,0, y el gradiente de pH termina en 3,0, o aproximadamente 3,2, o aproximadamente 3,4, o aproximadamente 3,6, o aproximadamente 3,8.

Las etapas de equilibrado, carga, lavado y elución constituyen un ciclo o un ciclo de unión y elución. Este ciclo de unión y elución de un ciclo típico de purificación de Proteína A suele ir seguido de una etapa de limpieza para eliminar los niveles traza de impurezas en la columna, seguido de otro ciclo de unión y elución. Una campaña de purificación típica está constituida por múltiples ciclos de unión y elución, uno detrás del otro, realizándose la etapa de limpieza entre ciclos o después de cada ciclo.

La limpieza de la resina de afinidad de Proteína A se practica comúnmente después de cada ciclo para asegurar que la resina realice la purificación de manera consistente durante todo el ciclo de vida de la resina, o en otras palabras, para preservar la capacidad de unión de la resina. La limpieza es especialmente importante para la resina de cromatografía de afinidad de Proteína A por dos razones: (1) la resina de Proteína A tiene un alto coste inicial en comparación con las resinas de intercambio iónico o de interacción hidrofóbica (HIC) y; (2) la resina de cromatografía de proteína A está expuesta típicamente al cultivo celular clarificado que contiene un mayor nivel de impurezas. Por lo tanto, algunas impurezas residuales pueden unirse a la resina de proteína A, conduciendo de ese modo a una pérdida de capacidad de unión o aumento de impurezas globales de elución al reutilizarse. Esto es altamente indeseable en un entorno de fabricación ya que conduce a una menor productividad (debido a una disminución en la capacidad de unión) y una menor pureza del producto. La limpieza de rutina después de cada ciclo de unión y elución de la Proteína A es, por lo tanto, crítica para garantizar un rendimiento consistente de la resina que conduce a una pureza del producto consistente y una producción del proceso.

La limpieza se logra típicamente con pH extremos, p. ej., utilizando H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,15 M (pH 1,5) o NaOH 0,1M (pH = 13), que son dos reactivos de limpieza de uso común. Por ejemplo, se ha recomendado y utilizado H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,15 M para la

familia ProSep® de resinas de afinidad de Proteína A. La ventaja de la limpieza con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> es que limpia la resina sin sacrificar la capacidad de unión de la resina de Proteína A. Por otro lado, se recomienda NaOH 0,1 M y se usa para la familia MabSelect SuRe® de resinas de afinidad de proteína A; sin embargo, las disoluciones alcalinas como NaOH podrían potencialmente disminuir la capacidad de unión de la resina de Proteína A en el tiempo debido a la desamidación del ligando de la proteína.

En algunas realizaciones descritas en este documento, la limpieza se realiza utilizando disoluciones tanto ácidas como alcalinas; en algunas realizaciones, una columna de cromatografía se pone en contacto con una disolución ácida y con una disolución alcalina después de cada ciclo. En otras realizaciones, una columna de cromatografía se pone en contacto con una disolución ácida o una disolución alcalina después de un ciclo, de manera que las disoluciones ácidas y alcalinas se usan alternativamente a través de la campaña de purificación. Por ejemplo, si la columna de cromatografía se pone en contacto con una disolución alcalina después del primer ciclo, a continuación se pone en contacto con una disolución ácida después del segundo ciclo, seguido de una disolución alcalina otra vez después del tercer ciclo y así sucesivamente. A la inversa, si la columna de cromatografía se pone en contacto con una disolución ácida después del primer ciclo, a continuación se pone en contacto con una disolución alcalina después del segundo ciclo, seguida de una disolución ácida después del tercer ciclo y así sucesivamente.

El uso de disoluciones ácidas y alcalinas para la limpieza da como resultado una eliminación sinérgica de impurezas, con relación al uso de solo una disolución ácida o alcalina. En otras palabras, el uso de disoluciones tanto ácidas como alcalinas para la limpieza (ya sea el uso de ambas después de un ciclo o el uso de una manera alternativa como se describe en el presente documento), da como resultado la eliminación de impurezas que es mayor que la suma de la eliminación con el uso de solo limpieza ácida o solo limpieza alcalina mediante un proceso de purificación. Sin desear estar sujeto a ninguna teoría, se contempla que las disoluciones ácidas y alcalinas eliminan cada una un tipo diferente de impureza.

Ligandos ilustrativos usados en los métodos descritos en el presente documento

Los métodos de acuerdo con la presente invención emplean ligandos de proteína A basados en el dominio C de la proteína A. En algunas realizaciones, un ligando usado en los métodos descritos en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, o al menos 85%, o al menos 90%, o al menos 95% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, un ligando de proteína A usado en los métodos descritos en este documento comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3. En otras realizaciones, un ligando de Proteína A usado en los métodos descritos en el presente documento comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:4. La presente invención también abarca variantes, fragmentos y derivados de estas secuencias, que se unen a una proteína que contiene Fc.

Soportes sólidos ilustrativos utilizados en los métodos descritos en la presente memoria

En algunas realizaciones, los ligandos de Proteína A utilizados en los métodos descritos en este documento se inmovilizan sobre un soporte, p. ej., un soporte sólido o un soporte soluble, para generar un medio o resina de cromatografía de afinidad adecuado para la separación de biomoléculas tales como, p. ej., inmunoglobulinas y otras proteínas que contienen Fc.

Soportes sólidos ilustrativos incluyen aquellos basados en polímeros sintéticos, p. ej., poliviniléter, alcohol polivinílico, polimetacrilato, poliácido, poliestireno, poliácido, polimetacrilato y policarbonato.

Los formatos de soporte sólido ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, una perla (esférica o irregular), una fibra hueca, una fibra sólida, una almohadilla, un gel, una membrana, un casete, una columna, un fragmento, una rodaja, una placa o un monolito.

Se puede usar cualquier técnica adecuada para unir un ligando descrito en este documento a un soporte sólido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ligando se puede unir a un soporte sólido a través de técnicas de acoplamiento convencionales que utilizan, p. ej., grupos amino y/o carboxi presentes en el ligando. Por ejemplo, los bisepóxidos, epiclorhidrina, CNBr, N-hidroxisuccinimida (NHS), etc., son reactivos de acoplamiento bien conocidos. En algunas realizaciones, se introduce un espaciador entre el soporte sólido y el ligando, que mejora la disponibilidad del ligando y facilita el acoplamiento químico del ligando al soporte,

En algunas realizaciones abarcadas por la presente invención, más de un sitio en un ligando está unido a un soporte sólido tal (es decir, a través de una unión multipunto).

En general, la unión de un ligandos de cromatografía basada en proteína A a un soporte sólido puede conseguirse de muchas maneras diferentes, la mayoría de las cuales son bien conocidas en la técnica, así como las descritas en el presente documento. Véase, p. ej., Hermanson et al., Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press, pp. 51-136 (1992).

Limpieza y desinfección de la columna de cromatografía de Proteína A

La limpieza de columnas de cromatografía es una práctica que se usa comúnmente después de cada ciclo para

mantener el rendimiento de la columna y alargar el tiempo de vida de la columna. Por lo general, después de completar cada ejecución, se carga una disolución de limpieza en la columna durante 15 a 30 minutos, seguido de un tampón de reequilibrio o un tampón de desinfección (si la columna está lista para el almacenamiento). Las disoluciones de limpieza comunes son NaOH 0,05-0,3 M o H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,15 M. El caudal durante la limpieza se determina típicamente en base a la resina específica que se va a usar y el sistema de cromatografía. Si bien, NaOH es una disolución de limpieza de uso común en la industria biofarmacéutica, la disolución ácida, tal como H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,15 M, también puede eliminar contaminantes de manera efectiva y se usa en algunos casos.

Para la cromatografía de proteína A, es común usar H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> para limpiar la familia de productos ProSep® mientras que NaOH se usa para la limpieza de la familia de productos MabSelect SuRe®. Sin embargo, la mayoría de los medios de Proteína A disponibles en el mercado solo se pueden limpiar con una disolución alcalina o una disolución ácida.

En el caso de los métodos descritos en el presente documento; sin embargo, una resina de Proteína A basada en el dominio C de *Staphylococcus aureus* inmovilizada sobre un soporte sólido se puede limpiar usando disoluciones tanto ácidas como alcalinas. El uso de disoluciones tanto alcalinas como ácidas da como resultado una eliminación sinérgica de impurezas no deseadas en comparación con cada disolución individualmente.

La desinfección de las columnas de cromatografía se realiza comúnmente después de que una columna se haya usado en una campaña y antes de que esté lista para su almacenamiento. Se carga una disolución de desinfección en la columna a un caudal predeterminado para 3-5 volúmenes de columna. A continuación el flujo se detiene para permitir un tiempo establecido para que el desinfectante trabaje para lograr una destrucción microbiana diana. El desinfectante se reemplaza con un tampón de almacenamiento y la columna está lista para el almacenamiento. Aunque el NaOH es un agente desinfectante común para el intercambio iónico y la cromatografía de interacción hidrofóbica, es menos duradero para la cromatografía de afinidad de Proteína A. Se sabe que el NaOH ataca las asparaginas en las proteínas, lo que conduce a la degradación de las proteínas. No es una excepción para el ligando de Proteína A. Se han realizado esfuerzos para mejorar la estabilidad alcalina del ligando de Proteína A mediante asparaginas mutantes; sin embargo, el NaOH aún degrada la Proteína A, solo que a un ritmo más lento con relación al tipo salvaje. Esto es especialmente un problema para la desinfección, ya que requiere una mayor concentración de NaOH (0,5 M) durante un período de tiempo más largo (es decir, 3-4 horas) en comparación con la limpieza con NaOH (0,1-0,3 M) durante 15-30 minutos.

Una disolución de desinfección más efectiva se describe en la presente memoria, referida como PAB. Consiste en ácido fosfórico 120 mM, ácido acético 167 mM, alcohol bencílico al 2,2%. PAB mata microbios con efectividad y rapidez. PAB ha sido descrito anteriormente como que se ha usado con la familia de productos ProSep®, que solo se puede limpiar con una disolución ácida, y fue co-desarrollado por Genentech y EMD Millipore Corporation (M. Rogers et al. J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4589-4596).

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Generación de ligandos SpA

Los genes sintéticos que codifican las proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQC ID NO:3 y la SEQ ID NO:4 se obtienen a partir del DNA 2.0 (Menlo Park, CA). El extremo 5' de cada gen sintético incluye un codón para una metionina iniciadora. Los extremos 5' y 3' de cada gen contienen sitios de restricción NdeI y BamHI, respectivamente. Estos genes sintéticos, así como el vector de expresión que se usa, es decir, pET11a (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA), se digieren con NdeI y BamHI (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich, MA), los fragmentos de ADN se separan en un gel de agarosa al 0,7% TAE y los fragmentos de ADN apropiados se escinden y purifican utilizando el kit de extracción de gel de QIAGEN (Valencia, CA). Los insertos purificados se ligan en el esqueleto de un pET11a o cualquier otro vector de expresión adecuado utilizando ADN ligasa T4 (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich, MA).

La reacción de ligación se transforma en *E. coli* competente DH5α (INVITROGEN, Carlsbad, CA), según las instrucciones del fabricante, se coloca en placas Technova LB que contienen 100 mg/ml de ampicilina y se incuba durante la noche a 37°C. Para obtener el ADN purificado, las colonias individuales se recogen y se cultivan durante la noche en LB que contiene 100 mg/ml de ampicilina. El ADN se purifica utilizando KITS spin mini-prep de QIAGEN (Valencia, CA). La identidad de los plásmidos recombinantes se confirma mediante análisis de digestión de restricción utilizando NdeI y BamHI (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich, MA).

#### Ejemplo 2: Expresión y purificación de ligandos basados en SpA

Se puede usar cualquier sistema de expresión bacteriano adecuado para expresar los diversos ligandos de SpA descritos en el presente documento. Por ejemplo, la proteína puede expresarse en una cepa de *Escherichia coli* como la cepa BL21(DE3) (PROMEGA, Madison W1) usando un vector pET como pET11a (EMD).

Se selecciona una colonia única de una placa y se cultiva durante la noche a 37°C en medio LB que contiene 100 µg/ml de ampicilina. El cultivo durante la noche se diluye 100 veces en medio LB recién preparado que contiene 100

µg/ml de ampicilina y se hace crecer hasta una densidad celular tal que la densidad óptica a 600 nm sea ~ 0,8. Después de la adición de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosida 1 mM, las células se cultivan durante dos horas adicionales. La expresión se confirma mediante análisis SDS-PAGE y transferencia Western.

5 Las células se recogen mediante centrifugación (4000 rpm, 4°C, 5 minutos) y se resuspenden en 3 ml de disolución salina tamponada con fosfato que contiene imidazol 20 mM. Las células se lisan por sonicación y los residuos celulares se sedimentan por centrifugación (4000 rpm, 4°C, 30 minutos). Los ligandos de SpA se purifican utilizando una resina de afinidad IgG de 50 ml (hIgG policlonal inmovilizada sobre vidrio de poro controlado), aplicando 500 ml de lisado celular. Las columnas se lavan con 30 ml de disolución salina tamponada con fosfato y el SpA se eluye en ácido cítrico 0,1 M, pH 3. El SpA se dializa durante la noche en agua Milli-Q® (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA). La concentración de proteína se confirma usando el espectrómetro UV en base al coeficiente de extinción teórico (Pace et al., Protein Science 4:2411 (1995)).

Ejemplo 3: Unión de ligandos basados en SpA a un soporte sólido

Posteriormente a la generación y expresión de diversos ligandos, como se describe en los Ejemplos 1 y 2, los ligandos se inmovilizan a través de la unión multipunto a un soporte sólido.

15 En un experimento ilustrativo, el ligando de Proteína A (secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3, 10 ~ 20 mg/ml) se inmoviliza a un soporte sólido de poliviniléter reticulado (materiales propiedad de Merck KGaA) mediante reacción de grupos epoxi sobre el soporte sólido y los numerosos grupos amino en los ligandos en presencia de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1~1,1 M durante la noche. (Hermanson *et. al.* Academic Press, 1992, página 118). La resina se designa como Resina A.

20 El método de acoplamiento de ligandos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:4 y la proteína A nativa (Lonza, Ltd., Suiza) son similares al proceso anterior y las resinas correspondientes se designan como Resina B y Resina C. Ejemplo 4: Exposición prolongada de las resinas A, B y C a disoluciones ácidas y alcalinas

25 En este experimento, cada una de las resinas A, B y C descritas anteriormente, se exponen a varias disoluciones ácidas y alcalinas. Se preparan las siguientes disoluciones: HCl (0,3%, v/v), pH 1,5; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,15 M), pH 1,5; NaOH 0,1 M y NaOH 0,5 M.

30 Las resinas A, B y C (2 ml de cada resina se usan por duplicado para cada condición de disolución) se transfieren a una columna desechable de 5" (Evergreen Scientific, Los Angeles, CA) y se acondicionan en una de las disoluciones mencionadas anteriormente durante 5 minutos. La disolución se elimina al vacío y la resina se transfiere a un tubo cónico de polipropileno de 15 ml (ThermoFisher, Waltham, MA) seguido de la adición de 10 ml de la disolución correspondiente. Los tubos de suspensión de resina en la disolución correspondiente se cargan en un agitador de tubos LabQuake® (ThermoFisher, Waltham, MA) a temperatura ambiente durante 25 horas, seguido de lavado en una columna desechable Evergreen de 5", 5 veces con 4 ml de agua Milli-Q® (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) tres veces.

Tabla 1: Muestras y condiciones de ensayo. Cada muestra se usa en duplicados.

	HCl, 0,3%, v/v	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 0,15 M	NaOH 0,1 M	NaOH 0,5 M
Resina A	+	+	+	+
Resina B	+	+	+	+
Resina C	+	+	+	+

35 Ejemplo 5. Evaluación de la capacidad de unión estática de las resinas A, B y C antes y después de exposición prolongada a ácidos y álcalis

40 En este experimento, cada una de las resinas A, B y C (en un volumen de 1 ml), con exposición a HCl al 0,3%; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,15 M; NaOH 0,1 M; o NaOH 0,5 M, junto con la muestra de control que se almacena en un tampón de almacenamiento de etanol al 20% con NaCl 150 mM, se convierte en una suspensión al 10% en agua Milli-Q® (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA). Se añade 1 ml de cada suspensión de resina a 15 ml de IgG policlonal (SERACARE, 1 mg/ml) en tampón salino de fosfato 10 mM y se mezcla suavemente durante 4 horas a temperatura ambiente. La reducción de la absorbancia UV a 280 nm se utiliza para calcular la capacidad de unión de la resina IgG antes y después de la exposición ácida o alcalina. El porcentaje de capacidad de unión de IgG retenida se calcula dividiendo la capacidad de unión de IgG después de la exposición ácida o alcalina por la de la muestra de control que no está expuesta a condiciones ácidas o alcalinas.

45 La Figura 1 muestra los resultados de tal experimento. Las tres muestras de resina demuestran una retención de más de 95% de la capacidad de unión inicial tras la exposición a HCl al 0,3% o H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,15 M durante 25 h con relación al control. Las resinas A y B retienen más del 95% de la capacidad de unión tras exposición a NaOH 0,1 M con relación

al control y aproximadamente 75% de la capacidad de unión tras exposición a NaOH 0,5M con relación al control. La resina C retiene aproximadamente el 65% de la capacidad de unión tras exposición a NaOH 0,1 M con relación al control y aproximadamente el 38% de la capacidad de unión al exponerse a NaOH 0,5 M con relación al control. La desviación estándar del ensayo es de aproximadamente 1-3%. Por lo tanto, la capacidad de unión retenida tras la exposición a la disolución alcalina de las resinas A y B se considera equivalente.

Ejemplo 6: Evaluación de la capacidad de unión dinámica de la Resina B antes y después de exposición prolongada a ácido

En este experimento, se utiliza un método estándar para ensayar la capacidad dinámica de la resina utilizando IgG policlonal comercial. Brevemente, la resina B de acuerdo con la presente invención se empaqueta en una columna Omnifit (6,6 mm x 50 mm) en Tris 50 mM w NaCl 25 mM, ETDA 5 mM, pH 7,2 (tampón EQ) y el caudal se establece en 100 cm/h. La columna empaquetada se equilibra con el tampón de EQ para 10 volúmenes de columna (CV). La IgG policlonal (Seracare, 2 mg/ml en tampón EQ, pH 7,2) se carga en la columna hasta que la radiación UV<sub>280nm</sub> alcanza más del 50% de la concentración inicial de IgG. Después de lavar con tampón de equilibrado la IgG se eluye con ácido acético 0,1 M, pH 3,0. Después del equilibrado de la columna utilizando el tampón EQ de la primera ejecución, la resina se lava con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,15 M durante 25 horas a un caudal de 50 cm/h, seguido de otra medición de la capacidad dinámica de IgG. Se llevan a cabo otras 25 h de exposición a H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,15 M seguidas de una tercera medición de la capacidad de unión dinámica. Un ciclo de exposición se define como la exposición durante 15 minutos. Por lo tanto, una exposición de 25 horas representa un total de 100 ciclos. Dos exposiciones de 25 horas representan un total de 200 ciclos de exposición.

La capacidad de unión dinámica al 10% de avance se calcula en base a la cantidad de IgG cargada cuando la UV<sub>280 nm</sub> alcanza el 10% de la concentración inicial de IgG. Las capacidades dinámicas de unión medidas antes y después de exposición 25 horas y 50 horas se comparan y muestran en la Figura 2. Ningún cambio significativo se observa en capacidad de unión dinámica de la resina después de 200 ciclos (15 min/ciclo) de exposición a H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,15 M.

Ejemplo 7: Evaluación de la capacidad de unión dinámica de la Resina B antes y después de exposición alcalina prolongada.

En este experimento, se utiliza un método estándar para ensayar la capacidad dinámica de la resina utilizando una IgG policlonal comercial. Brevemente, la resina B de acuerdo con la presente invención se empaqueta en una columna Omnifit (6,6 mm x 50 mm) en Tris 50 mM w NaCl 25 mM, ETDA 5 mM, pH 7,2 y el caudal se establece en 100 cm/h. La columna empaquetada se equilibra con tampón EQ para 10 volúmenes de columna (CV). La IgG policlonal (Seracare, 2 mg/ml en tampón EQ, pH 7,2) se carga en la columna hasta que la radiación UV<sub>280nm</sub> alcanza más del 50% de la concentración inicial de IgG. Después de lavar con tampón de equilibrio, la IgG se eluye con ácido acético 0,1 M, pH 3,0. Después de equilibrado de la columna utilizando el tampón EQ de la primera ejecución, la resina se lava con NaOH 0,1 M durante 25 horas a un caudal de 50 cm/h, seguido de otra medición de capacidad dinámica de IgG. Se llevan a cabo otras 25 horas de exposición a NaOH 0,1 M, seguido de una tercera medición de la capacidad de unión dinámica. Un ciclo de exposición se define como 15 minutos de exposición. Por lo tanto, una exposición de 25 horas representa un total de 100 ciclos. Dos exposiciones de 25 horas representan un total de 200 ciclos de exposición. El ciclo de exposición se define como la exposición durante 15 minutos. Así, una exposición de 25 h representa un total de 100 ciclos.

La capacidad de unión dinámica de 10% se calcula en función de la cantidad de IgG cargada cuando UV<sub>280 nm</sub> alcanza el 10% de la concentración inicial de IgG. Las capacidades de enlace dinámicas medidas antes y después de exposiciones de 25 y 50 horas se comparan y muestran en la Figura 2. No se observa ningún cambio significativo en la capacidad de unión dinámica de la resina en 200 ciclos (15 minutos/ciclo) de exposición a NaOH 0,1 M.

Ejemplo 8: Evaluación de la capacidad de unión dinámica de la Resina B antes y después de una exposición prolongada a ácido y álcali de manera alterna

En este experimento, se utiliza un método estándar para ensayar la capacidad dinámica de la resina utilizando IgG policlonal comercial. Brevemente, la resina B de acuerdo con la presente invención se empaqueta en una columna Omnifit (6,6 mm x 50 mm) en Tris 50 mM w NaCl 25 mM, ETDA 5 mM, pH 7,2 y el caudal se establece en 100 cm/h. La columna empaquetada se equilibra con tampón EQ para 10 volúmenes de columna (CV). La IgG policlonal (Seracare, 2 mg/ml en tampón EQ, pH 7,2) se carga en la columna hasta que UV<sub>280nm</sub> alcanza más del 50% de la concentración inicial de IgG. Después de lavar con tampón de equilibrado, la IgG se eluye con ácido acético 0,1 M, pH 3,0. Después del equilibrado de la columna utilizando el tampón EQ de la primera ejecución, la resina se lava primero con NaOH 0,1 M durante 2,5 h (10 ciclos de 15 min cada una) a un caudal de 50 cm/h, seguido de una exposición de 30 minutos al tampón EQ neutro, referido como etapa uno. La resina se lava posteriormente usando H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,15M durante 2,5 horas a un caudal de 50 cm/h, seguido de una exposición de 30 min a un tampón EQ, referido como la etapa dos. Las etapas uno y dos se repiten 4 veces más para alcanzar una exposición total ácida y alcalina de 25 horas, o 100 ciclos, exponiendo así la resina a condiciones ácidas y alcalinas de manera alterna. Posteriormente, se lleva a cabo otra medición de la capacidad dinámica de IgG seguida de otras 25 horas de exposición alterna a NaOH 0,1 M y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,15 M como se describe anteriormente. Esto es seguido por otra medición de la capacidad de unión dinámica. La capacidad de unión dinámica de 10% se calcula en función de la cantidad de

IgG cargada cuando  $UV_{280\text{ nm}}$  alcanza el 10% de la concentración inicial de IgG. Las capacidades de unión dinámica medidas antes y después de 25 horas y 50 horas de exposición alterna a ácido y álcali se comparan y se muestran en la Figura 2. No se observa ningún cambio significativo en la capacidad de unión dinámica de la resina al alternar la exposición del ácido fosfórico y el NaOH hasta un total de 200 ciclos (15 minutos/ciclo).

5 Ejemplo 9: Pureza del producto obtenida con la Resina B después de exposición prolongada a ácido, después de exposición prolongada a álcalis y después de una exposición prolongada alterna a ácidos y álcalis.

10 Policlonal. Se añade IgG (Seracare, Milford, MA) a una alimentación de CHO-S que no se expresa (Xcellerex, Marlborough, MA) y se filtra a través de un filtro estéril de 0,22  $\mu\text{m}$ . La concentración final de IgG en la alimentación filtrada es de 3,5 mg/ml. Esta alimentación se carga en las columnas de cromatografía de los Ejemplos 6 (expuesta a ácidos), 7 (expuesta a álcalis) y 8 (expuesta a ácidos y álcalis alternos), así como una columna de control empaquetada con resina B en disolución de almacenamiento (20% de etanol con NaCl 150 mM), hasta 20 mg de IgG por ml de resina a los 4 minutos de tiempo de permanencia. La resina se lava con citrato 0,1 M, pH 5,5 y se eluye con ácido acético 0,1 M, pH 3,0. El conjunto de elución se analiza para determinar el nivel de proteína de la célula huésped utilizando el kit ELISA 3G CHO-S de Cygnus (Southport, NC). La pureza del producto se muestra en la Tabla 2 a continuación.

Aunque los niveles de proteína de la célula huésped (HCP) de estas muestras son todos bajos, la muestra de resina que se ha limpiado alternando disoluciones ácidas y alcalinas muestra el nivel más bajo de HCP en el grupo de elución, probablemente debido al efecto de limpieza sinérgica de la limpieza con ácido y álcali.

Tabla 2

Resina, exposición	Proteínas de la célula huésped (ng/mg de IgG)
Control de resina B (resina virgen sin exposición ácida o alcalina)	8,4
Resina B, 200 ciclos de exposición a ácido	5,9
Resina B, 200 ciclos de exposición a álcali	6,9
Resina B, 200 ciclos de exposición ácido/álcali	3,2

20

Ejemplo 10. Estudio de la capacidad de unión estática retenida de las resinas tras la exposición a disolución de PAB

25 Las resinas A y B (5 ml cada una, usadas por duplicado para cada condición) se empapan en disolución de PAB (ácido fosfórico 120 mM, ácido acético 167 mM, alcohol bencílico al 2,2% (v/v)) durante 4 horas o durante 24 horas. Las muestras de resina empapada en PAB se lavan inmediatamente con tampón salino fosfato (10 mM, pH 7,4) en 2 volúmenes de columna al menos tres veces. A continuación se añade resina a un volumen de 1 ml de agua Milli-Q® (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA), que a continuación se convierte en una suspensión al 10%. Se añade 1 ml de esta suspensión a 15 ml de IgG policlonal (SERACARE, 1 mg/ml) en tampón salino de fosfato 10 mM y se agita durante 4 horas a temperatura ambiente. La reducción de la absorbancia UV a 280 nm se utiliza para calcular la capacidad antes y después de la exposición a PAB. La capacidad de unión de IgG retenida se calcula dividiendo la capacidad de unión de IgG después de la exposición a PAB a 4 h y a 24 h por la del control sin exposición a PAB. No se observan cambios significativos en la capacidad de unión estática después de 4 horas y 24 horas de exposición, como se muestra en la Tabla 3.

30

Tabla 3: Porcentaje promedio de la capacidad de unión estática retenida de las Resinas A y B tras la exposición a la disolución de PAB después de 4 y 24 horas con relación al control.

Tiempo de exposición PAB (h)	Resina A		Resina B	
	Capacidad de unión estática retenida promedio (porcentaje)	Coefficiente de variante	Capacidad de unión estática retenida promedio (porcentaje)	Coefficiente de variante
0	100%	3%	100%	3%
4	102%	2%	102%	2%
24	102%	2%	101%	2%

35

Ejemplo 11. Estudio de limpieza de las Resinas A y B con una alimentación de CHO que no se expresa

Las capacidades de limpieza de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y NaOH para las resinas de Proteína A expuestas a cultivos celulares

clarificados son probablemente diferentes, ya que  $H_3PO_4$  es extremadamente ácido, mientras que NaOH es altamente alcalino.

La diferencia en la capacidad de limpieza se examina y compara en base a lo que queda en una resina de Proteína A ensuciada después de la limpieza con  $H_3PO_4$  y NaOH.

- 5 Se utiliza un cultivo celular clarificado por CHO-S que no se expresa para ensuciar las columnas empaquetadas con las resinas A y B para comprender la capacidad de limpieza de una disolución ácida o alcalina. Las resinas A y B se empaquetaron en columnas Omnifit (6,6 mm i.d. x 3 cm de altura del lecho) con dos columnas cada una (dos columnas de resina A y dos columnas con resina B). El caudal de este ensayo se establece en 100 cm/h. Las cuatro columnas se equilibran con el tampón EQ como se describe anteriormente y se cargan/recirculan con la disolución de cultivo celular durante 24 horas. Un conjunto de columnas con las resinas A y B se limpian con NaOH 0,1 M durante 30 minutos y a continuación se vuelven a equilibrar con tampón EQ durante 30 minutos. El otro conjunto de columnas con resinas A y B se limpian con  $H_3PO_4$  0,15 M, pH 1,5 durante 30 min y luego se vuelve a equilibrar con tampón de EQ durante 30 min. La resina en el centímetro superior de cada columna se retira para su análisis.

Ejemplo 12. Extracción de resina y análisis de los extractantes del Ejemplo 11

- 15 La resina de la parte superior de las columnas en el Experimento 11 se lava adicionalmente con tampón de equilibrado y se extrae con SDS al 2% en Tris 20 mM a pH 7,0 a 50°C durante la noche a 250 rpm en una incubadora. Al día siguiente, las muestras se centrifugan a 13500 rpm en una microcentrifuga.

- 20 A continuación se retira el SDS y se intercambia a un tampón de equilibrado utilizando un dispositivo Centricon (3KD, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) después de al menos 5 intercambios de tampón. Se analiza una pequeña alícuota del extracto de resina intercambiada con tampón mediante SDS-PAGE, gel 2D y/o LC-MS.

- 25 Como se observó para la resina A, la limpieza ácida y la limpieza alcalina eliminan diferentes especies de proteínas del huésped en un grado diferente. Esto demuestra que la limpieza ácida y alcalina puede eliminar impurezas diferentes de una columna sucia. Por lo tanto, alternar la limpieza con una disolución ácida, como  $H_3PO_4$ , y una disolución alcalina, como NaOH, da como resultado la eliminación sinérgica de impurezas y un efecto de limpieza más efectivo de una columna de Proteína A, lo que prolonga la vida útil de la columna .

- 30 A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, cultivos celulares, condiciones de tratamiento, etc., utilizados en la memoria descriptiva, incluidas las reivindicaciones, deben entenderse como que están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenden obtener mediante la presente invención. A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "al menos" que precede a una serie de elementos se refiere a todos los elementos de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar utilizando solo la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en este documento. Dichos equivalentes están destinados a estar incluidos por las siguientes reivindicaciones.

35 **Listado de secuencias**

<110> EMD MILLIPORE CORPORATION

<120> MÉTODOS DE LIMPIEZA DE UNA COLUMNA DE CROMATOGRAFÍA Y AFINIDAD BASADA EN PROTEÍNA A

<130> P 13/136 PCT

- 40 <140>  
<141>

<150> 61/873,450  
<151> 04-09-2013

<160> 4

- 45 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 58  
<212> PRT  
<213> Staphylococcus aureus

ES 2 737 078 T3

<400> 1

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
50 55

<210> 2

<211> 174

5 <212> ADN

<213> Staphylococcus aureus

<400> 2

gctgataaca aattcaacaa ggagcaacag aacgcattct atgaaattct gcacctgccg 60

aatctgacgg aggagcaacg taacggcttt atccagtccc tgaaggatga tccgtctgtg 120

tctaaagaga tcctggcgga ggcaaaaaaaaa ctgaatgatg cacaagctcc gaaa 174

<210> 3

10 <211> 290

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

15 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético "

ES 2 737 078 T3

<400> 3

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln  
 20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn  
 50 55 60

Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu  
 65 70 75 80

Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro  
 85 90 95

Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala  
 100 105 110

Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
 115 120 125

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn  
 130 135 140

Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile  
 145 150 155 160

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp  
 165 170 175

Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His  
 180 185 190

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu  
 195 200 205

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
 210 215 220

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu  
 225 230 235 240

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu

ES 2 737 078 T3

245 250 255

Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val  
260 265 270

Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
275 280 285

Pro Lys  
290

<210> 4  
<211> 271  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético "

10 <400> 4  
Ala Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
1 5 10 15

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe  
50 55 60

Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys  
65 70 75 80

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu  
85 90 95

Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys  
100 105 110

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr  
115 120 125

Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser  
130 135 140

Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln

ES 2 737 078 T3

145		150		155		160									
Ala	Pro	Lys	Phe	Asn	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu
				165					170						175
His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Lys	Phe	Ile	Gln	Ser
			180					185					190		
Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Ser	Lys	Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys
		195					200					205			
Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	Phe	Asn	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn
	210					215					220				
Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg
225						230				235					240
Asn	Lys	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Ser	Lys	Glu
				245					250					255	
Ile	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	
			260					265					270		

## REIVINDICACIONES

1. Un método para conservar la capacidad de unión de una columna de cromatografía de afinidad durante uno o más ciclos de purificación de afinidad, comprendiendo el método limpiar la columna de cromatografía después de uno o más ciclos de purificación de afinidad con una disolución ácida que tiene un pH inferior a 3,0, en donde la columna de cromatografía de afinidad comprende un medio de Proteína A que comprende un ligando de Proteína A derivado del dominio C de la Proteína A de *Staphylococcus aureus* inmovilizada sobre un soporte sólido que comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en poliviniléter, alcohol de polivinilo, polimetacrilato, poliacrilato, poliestireno, poliacrilamida, polimetacrilamida y policarbonato.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ligando de Proteína A comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO:3 y la SEQ ID NO:4.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la disolución ácida comprende un pH de 2,5, 2,0 o 1,5.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la capacidad de unión se conserva:
  - durante 10 o más ciclos;
  - durante 50 o más ciclos;
  - durante 100 o más ciclos; o
  - durante 200 o más ciclos.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el soporte sólido comprende un polímero de poliviniléter.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la disolución ácida comprende ácido fosfórico.
7. Un método para desinfectar una columna de cromatografía de afinidad después de una campaña mientras se mantiene la capacidad de unión de la columna, en donde el método comprende poner en contacto la columna de cromatografía de afinidad con una disolución que comprende ácido fosfórico, ácido acético y alcohol bencílico durante al menos tres horas, y en donde la columna de cromatografía de afinidad comprende un medio de Proteína A que comprende un ligando de Proteína A derivado del dominio C de la proteína A de *Staphylococcus aureus* inmovilizada sobre un soporte sólido que comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en poliviniléter, alcohol de polivinilo, polimetacrilato, poliacrilato, poliestireno, poliacrilamida, polimetacrilamida y policarbonato.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el ligando de Proteína A comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO:3 y la SEQ ID NO:4.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el soporte sólido comprende un polímero de poliviniléter.
10. Un método para limpiar una columna de cromatografía de afinidad usando disoluciones tanto ácidas como alcalinas, comprendiendo el método:
  - poner en contacto la columna con disoluciones tanto ácidas como alcalinas entre ciclos de purificación por afinidad; o
  - poner en contacto la columna con una disolución ácida después de un ciclo o con una disolución alcalina después de un ciclo, de modo que las disoluciones ácidas y alcalinas se usen de manera alterna, en donde la columna de cromatografía de afinidad comprende un medio de Proteína A que comprende un ligando de Proteína A derivado del dominio C de la proteína A de *Staphylococcus aureus* inmovilizado en un soporte sólido.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el soporte sólido comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en poliviniléter, alcohol de polivinilo, polimetacrilato, poliacrilato, poliestireno, poliacrilamida, polimetacrilamida y policarbonato.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la disolución ácida comprende ácido fosfórico.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde La disolución alcalina comprende hidróxido de sodio.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el método da como resultado una eliminación sinérgica de impurezas.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el ligando comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO:3 o la SEQ ID NO:4.

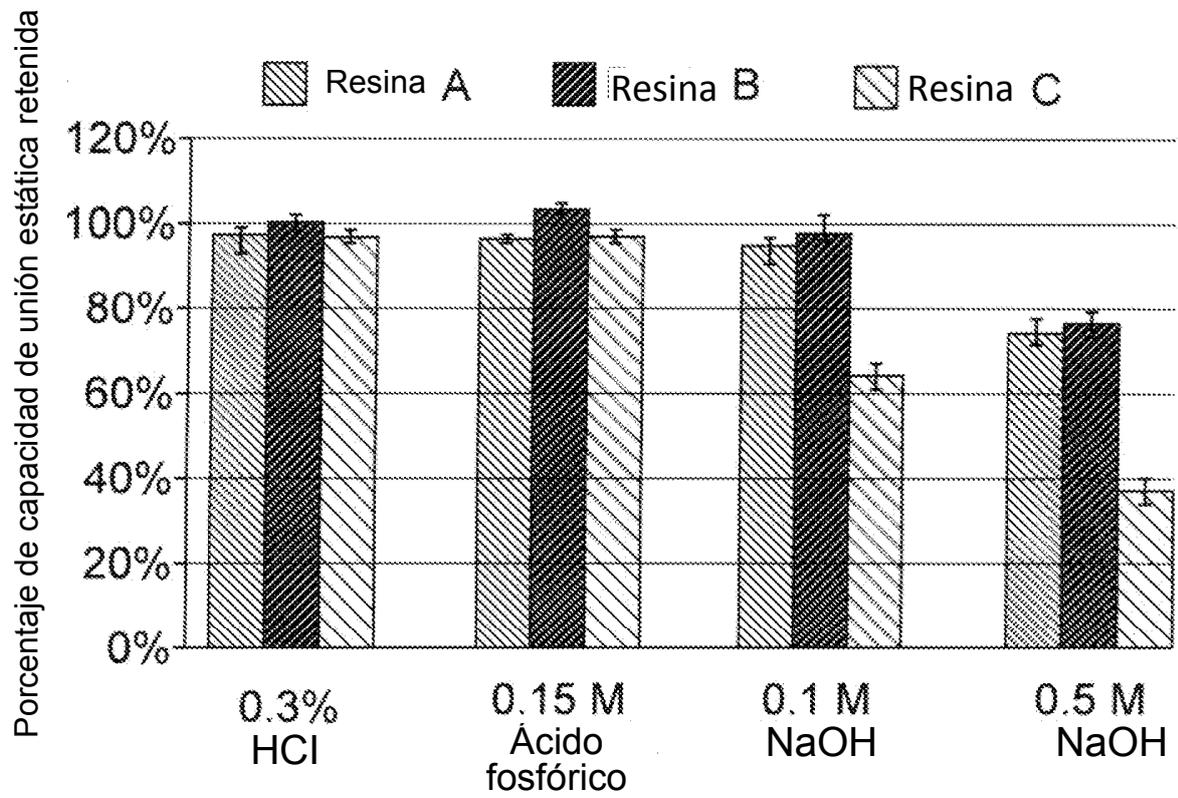


Figura 1

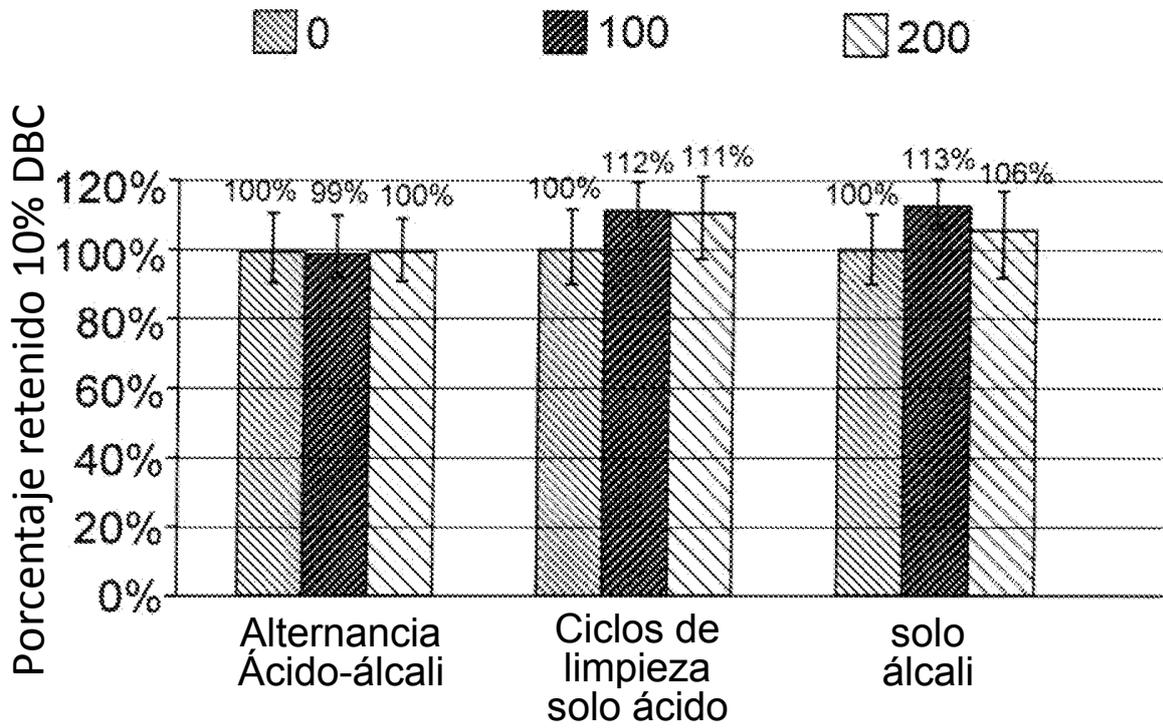


Figura 2