

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 210**

51 Int. Cl.:

**C08F 8/00** (2006.01)

**C08F 8/02** (2006.01)

**C07K 1/30** (2006.01)

**C07K 1/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2011 PCT/US2011/036648**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2011 WO11146394**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2011 E 11721929 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2571903**

54 Título: **Polímeros sensibles a estímulos para la purificación de biomoléculas**

30 Prioridad:

**17.05.2010 US 39576910 P**

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

**16.04.2020**

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)  
400 Summit Drive  
Burlington, MA 01803 , US**

72 Inventor/es:

**JABER, JAD;  
MOYA, WILSON;  
HAMZIK, JAMES;  
BOUDIF, AREZKI;  
ZHANG, YU;  
SOICE, NEIL;  
CHARKOUDIAN, JOHN y  
SINGH, NRIPEN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 754 210 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

Polímeros sensibles a estímulos para la purificación de biomoléculas

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a polímeros útiles para la purificación de proteínas. En particular, la presente invención se refiere a métodos que usan polímeros sensibles a estímulos útiles para la purificación de una molécula objetivo a partir de una muestra que contiene la molécula objetivo y una y más impurezas.

### Antecedentes

10 La purificación eficiente y económica a gran escala de biomoléculas como, por ejemplo, proteínas terapéuticas, que incluyen los anticuerpos, son una consideración cada vez más importante para las industrias biotecnológica y farmacéutica. En general, los procesos de purificación son bastante elaborados y costosos, e incluyen muchas etapas diferentes. Por ejemplo, típicamente, en el caso de las proteínas, las proteínas se producen usando métodos de cultivo celular, por ejemplo, usando líneas celulares de mamífero o bacterianas diseñadas para producir la proteína de interés mediante la inserción de un plásmido recombinante que contiene el gen que codifica esa proteína. En general, después de la expresión de la proteína objetivo, su separación de uno o más componentes indeseados que incluyen, por ejemplo, proteínas de células huésped, subproductos de los medios y ADN, plantea un desafío formidable. Dicha separación es especialmente importante cuando las proteínas terapéuticas se destinan al uso en humanos y deben ser aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA).

20 En general, los procesos de separación y/o purificación que se utilizan actualmente para las proteínas incluyen al menos las siguientes etapas: lisis celular para recuperar una proteína intracelular o recuperación de una proteína de los medios en caso de una proteína secretada; eliminación de células y restos celulares mediante centrifugación diferencial o filtración para obtener una muestra clarificada que contiene la proteína de interés; y el uso de una variedad de medios de cromatografía en un proceso de múltiples etapas para separar una proteína de interés de las diversas impurezas de la muestra.

25 Se han empleado diversos tipos de polímeros, incluidos los polielectrolitos, en una o más etapas para la purificación de biomoléculas, especialmente proteínas. Por ejemplo, el uso de polielectrolitos en la floculación para purificar proteínas está bien establecido (véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional PCT N° WO2008/091740). Esto se puede lograr con una amplia gama de polímeros, y la única característica general requerida es que el polímero debe tener cierto nivel de interacción con una especie de interés (por ejemplo, una molécula objetivo o una impureza). La metodología más común es el uso de polímeros que contienen especies iónicas, como los polielectrolitos. Generalmente, los polielectrolitos se añaden a la mezcla de proteínas y la purificación se logra mediante floculación selectiva de uno o más componentes de la mezcla. Un inconveniente crucial de este enfoque es que deben añadirse niveles cuidadosamente controlados de polielectrolitos para evitar la contaminación con el polímero residual (por ejemplo, cuando el nivel de polímero es demasiado alto) o la floculación ineficiente (por ejemplo, cuando el nivel de polímero es demasiado bajo). Debido a que el intercambio iónico y otros medios de cromatografía cargados se usan habitualmente en la purificación de proteínas, los polielectrolitos residuales pueden unirse potencialmente a los medios utilizados en las etapas de purificación posteriores, lo que contamina y complica el proceso.

40 Recientemente, se ha desarrollado una tecnología que supera algunos de los desafíos asociados con el uso de polímeros para la purificación de biomoléculas (véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT n° WO 2008/079302 A2). Por ejemplo, se han desarrollado polímeros sensibles a estímulos o "inteligentes" que pueden unirse tanto a componentes solubles (p. ej., proteínas de la célula huésped, ADN, aditivos de cultivo celular) como insolubles (p. ej., células y restos celulares) (véanse, p. ej., las Publicaciones de EE. UU. N°s 20080255027 y 20090036651). Aunque los polímeros sensibles a estímulos muestran ser muy prometedores en general, un desafío crucial que afronta el uso generalizado de tales polímeros es la existencia de un estímulo simple que se pueda implementar en una variedad de escalas, que van desde la escala de laboratorio hasta la escala de gran producción.

### 45 Sumario de la invención

La presente invención proporciona nuevos métodos para separar una molécula objetivo de una o más impurezas en una muestra, de acuerdo con las reivindicaciones. Los polímeros utilizados en los métodos de la invención son fácilmente escalables, y funcionan en un amplio intervalo de pH y conductividad, permitiendo así su uso en la purificación de una amplia gama de biomoléculas que incluyen, por ejemplo, las proteínas terapéuticas.

50 En algunas realizaciones de acuerdo con la presente invención, se usa un polímero sensible a estímulos que comprende un esqueleto de polielectrolito que comprende uno o más grupos hidrófobos, donde el polímero es capaz de unirse y precipitar una biomolécula de interés de una muestra después de la adición de un estímulo.

55 El esqueleto de polielectrolito de un polímero útil en la presente invención comprende al menos dos unidades monoméricas o al menos tres unidades monoméricas. En algunas realizaciones, al menos el 50% de las unidades monoméricas comprenden una carga. En otras realizaciones, cada unidad monomérica del esqueleto de polielectrolito comprende una carga.

En algunas realizaciones, el polímero sensible a estímulos útil en la presente invención comprende un esqueleto de poliamina. En algunas realizaciones, uno o más grupos hidrófobos son un grupo fenilo.

5 Los polímeros sensibles a estímulos útiles en la presente invención son útiles para purificar una molécula objetivo deseada, y lo hacen separando la molécula objetivo deseada de una o más entidades indeseables presentes en una muestra junto con la molécula objetivo deseada.

10 Por consiguiente, en algunas realizaciones, un polímero sensible a estímulos útil en la presente invención se une y precipita una biomolécula de interés, que es ella misma la molécula objetivo deseable unida y precipitada por el polímero sensible a estímulos. En otras realizaciones, un polímero sensible a estímulos se une y precipita una biomolécula de interés, que es una entidad indeseable presente en una muestra junto con la molécula objetivo deseable.

En algunas realizaciones, la biomolécula de interés es un polipéptido terapéutico (es decir, la molécula objetivo deseable). En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal).

15 En otras realizaciones, la biomolécula de interés se selecciona del grupo que consiste en proteínas de la célula huésped, ADN, ARN, lípidos, virus, endotoxinas, aditivos de cultivo celular, células enteras y restos celulares.

En algunas realizaciones, un polímero útil en la presente invención es sensible a un estímulo que es una sal formadora de complejos.

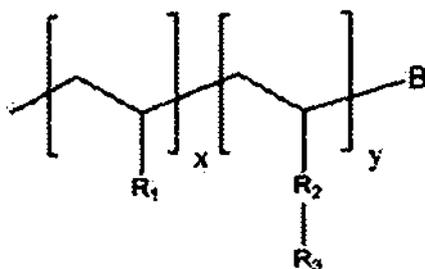
20 La presente invención incluye métodos para usar los polímeros descritos en la presente memoria. Los polímeros sensibles a estímulos son únicos e inventivos respecto de los polímeros descritos en la técnica anterior, en el sentido de que sustituyen o mejoran una o más etapas en un proceso de purificación, para de ese modo aumentar sustancialmente la pureza general de una molécula objetivo que se desea purificar o separar de una o más entidades indeseables.

25 Se proporciona un método para aumentar la pureza de una molécula objetivo, en el que el método comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra que comprende una molécula objetivo y una o más impurezas; (b) poner en contacto la muestra con un polímero sensible a estímulos que comprende un esqueleto de polielectrolito que comprende uno o más grupos hidrófobos unidos al esqueleto en un primer conjunto de condiciones adecuadas para que el polímero se una a la molécula objetivo en disolución, para formar un complejo de polímero y la molécula objetivo; y (c) añadir un estímulo a la muestra en un segundo conjunto de condiciones adecuadas para precipitar el complejo de la disolución, donde la precipitación del complejo da como resultado la separación de la molécula objetivo de una o más impurezas, por lo que se aumenta la pureza de la molécula objetivo.

En algunas realizaciones de acuerdo con los métodos de la presente invención, el método comprende además la etapa de recuperar una molécula objetivo del complejo.

35 En otra realización, un polímero sensible a estímulos se une y precipita una o más impurezas, en lugar de la molécula objetivo, donde la precipitación de un complejo del polímero y una o más impurezas da como resultado la separación de la molécula objetivo de una o más impurezas, por lo que se aumenta la pureza de la molécula objetivo. Por consiguiente, dicho método comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra que comprende una molécula objetivo y una o más impurezas; (b) poner en contacto la muestra con un polímero sensible a estímulos que comprende un esqueleto de polielectrolito que comprende uno o más grupos hidrófobos unidos al esqueleto en un primer conjunto de condiciones adecuadas para que el polímero se una a las impurezas, para formar un complejo de polímero y la o las impurezas; y (c) añadir un estímulo a la muestra en un segundo conjunto de condiciones adecuadas para precipitar el complejo, donde la precipitación del complejo da como resultado la separación de la molécula objetivo de una o más impurezas, por lo que se aumenta la pureza de la molécula objetivo.

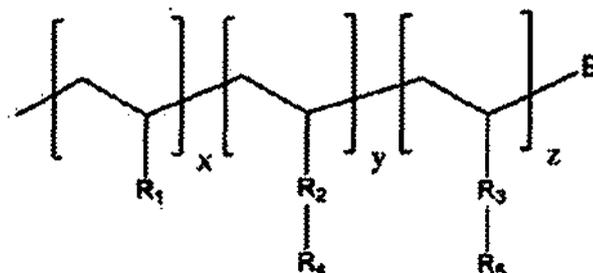
En algunas realizaciones, un polímero sensible a estímulos útil en la presente invención comprende la siguiente estructura:



45 donde x e y representan unidades monoméricas del polímero; R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son grupos cargados que forman una parte del esqueleto de polielectrolito (B); y R<sub>3</sub> es un grupo hidrófobo unido a un grupo cargado del esqueleto. La proporción de

unidades monoméricas y (es decir, que tienen un grupo hidrófobo unido al esqueleto) respecto del número total de unidades monoméricas (es decir, la suma de unidades monoméricas x e y) representa el "porcentaje de modificación hidrófoba" del polímero.

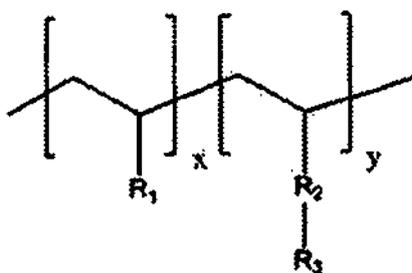
5 En algunas realizaciones, un polímero sensible a estímulos útil en la presente invención comprende la siguiente estructura:



10 donde x, y y z son unidades monoméricas del polímero; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son grupos cargados que forman parte del esqueleto de polielectrolito (B); R<sub>4</sub> es un grupo hidrófobo unido a un grupo cargado del esqueleto; y R<sub>5</sub> es un grupo funcional unido a un grupo cargado del esqueleto. La proporción de unidades monoméricas y (es decir, que tienen un grupo hidrófobo unido al esqueleto) respecto del número total de unidades monoméricas del polímero (es decir, la suma de unidades monoméricas x, y y z) representa el "porcentaje de modificación hidrófoba" del polímero. Además, la proporción de unidades monoméricas z (es decir, que tienen un grupo funcional unido a un grupo cargado del esqueleto) respecto del número total de unidades monoméricas (es decir, la suma de unidades x, y y z) representa el "porcentaje de modificación de grupo funcional" del polímero.

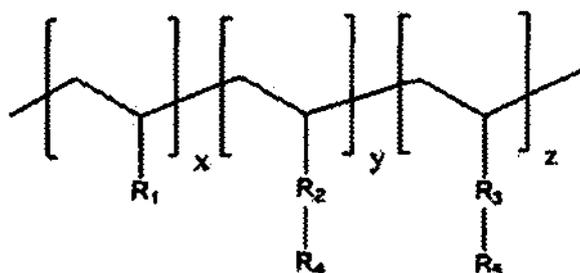
15 En general, se entiende que un polímero abarcado por la presente invención puede tener un número "n" de cualquiera de las unidades monoméricas x, y o z, descritas en la presente memoria, donde n es igual o mayor que dos.

En otras realizaciones, un polímero sensible a estímulos útil en la presente invención comprende la siguiente estructura:



20 donde x e y representan unidades monoméricas; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> son grupos amina alifática (por ejemplo, aminas primarias o secundarias y/o aromáticas) que forman parte de un esqueleto que contiene carbono de un polielectrolito; y R<sub>3</sub> es un grupo hidrófobo unido al grupo amina R<sub>2</sub> y contiene 4 o más átomos de carbono (por ejemplo, un grupo alquilo, un grupo alqueno, un grupo aralqueno o un grupo fluorocarburo). En algunas realizaciones, la proporción de y (es decir, unidades monoméricas que tienen un grupo hidrófobo unido a un grupo cargado del esqueleto de polielectrolito) respecto de x (es decir, un grupo cargado sin modificar del esqueleto de polielectrolito) es 0,01 a 0,75 o 0,05 a 0,75. Por consiguiente, el porcentaje de modificación de grupo hidrófobo sería del 1% al 75% o del 5% al 75% del total de unidades monoméricas de polielectrolito (es decir, x + y).

En otras realizaciones más, un polímero sensible a estímulos útil en la presente invención comprende la siguiente estructura:



30 donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son grupos amina alifática que forman parte del esqueleto de polielectrolito que contienen carbono

(por ejemplo, aminas primarias o secundarias y/o aminas aromáticas); R<sub>4</sub> es un grupo hidrófobo que contiene 4 o más átomos de carbono y se selecciona de grupos alquenoilo, aralquilo y aralquenoilo; y R<sub>5</sub> es un grupo hidrófobo que contiene 4 o más de 4 átomos de carbono y se selecciona de un grupo alquilo o fluorocarbono. La proporción de unidades monoméricas y respecto del número total de unidades monoméricas de polielectrolito está entre 0,01 y 0,75. La proporción de unidades monoméricas z respecto del número total de unidades monoméricas de polielectrolito está entre 0,05 y 0,5 o entre 0,01 y 0,5. Por consiguiente, el porcentaje de modificación de grupo hidrófobo es del 1% al 75% o del 5% al 75%, y el porcentaje de modificación de grupo funcional es del 1% al 50% o del 5% al 50%.

Los métodos adicionales para usar los polímeros sensibles a estímulos de acuerdo con la presente invención incluyen métodos que permiten la purificación de una molécula objetivo o producto de interés (por ejemplo, un anticuerpo) mientras se minimiza la cantidad de polímero residual en la muestra.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para separar una molécula objetivo (p. ej., un anticuerpo) de una o más impurezas usando un polímero sensible a estímulos de acuerdo con la presente invención mientras se minimizan las cantidades residuales de polímero, donde el método comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra que comprende una molécula objetivo y una o más impurezas; (b) poner en contacto la muestra con un polímero sensible a estímulos en un primer conjunto de condiciones adecuadas para que el polímero se una a las impurezas, para formar un primer complejo de polímero y una o más impurezas, donde el primer conjunto de condiciones comprende ajustar el pH o la concentración de sal de la muestra antes o después de la adición del polímero; (c) precipitar el primer complejo de la muestra en un segundo conjunto de condiciones; (d) poner en contacto la muestra con un ion multivalente, para formar así un segundo complejo de polímero residual e ion multivalente; (e) precipitar el segundo complejo; y (f) recuperar la molécula objetivo de la muestra; para separar la molécula objetivo de una o más impurezas de la muestra mientras se reduce la cantidad de polímero residual en la muestra.

En algunas realizaciones, la molécula objetivo es un anticuerpo. En una realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En una realización particular, la recuperación de la molécula objetivo en diversos métodos según la presente invención comprende una etapa de cromatografía. En otra realización, la recuperación de la molécula objetivo comprende una etapa de filtración.

En algunas realizaciones, los métodos de acuerdo con la presente invención pueden incluir dos o más etapas que emplean un polímero sensible a estímulos de acuerdo con la invención. Por ejemplo, se puede usar un polímero sensible a estímulos para precipitar una o más impurezas en una etapa del proceso de purificación, y se puede usar un polímero diferente o igual para precipitar una molécula objetivo o el producto deseado en una etapa diferente del proceso.

En algunas realizaciones, la o las impurezas se seleccionan del grupo que consiste en proteínas de la célula huésped, ADN, ARN, agregados de anticuerpos, virus, endotoxinas, células completas, restos celulares y aditivos de cultivo celular.

### 35 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un esquema que representa la reacción de un polímero de polialilamina con cloruro de bencilo.

La Figura 2 representa el esquema de reacción para el ácido hexanoico y la polialilamina modificada con terc-butilo (HC-t-BuMPAA)

La Figura 3 es un gráfico que representa el efecto del cloruro de sodio sobre el estímulo de ion multivalente y la capacidad de respuesta al pH del ácido hexanoico y la polialilamina modificada con terc-butilo (HC-t-BuMPAA). El eje X representa el pH y el eje Y representa la turbidez del concentrado (es decir, la salida de una centrifuga).

La Figura 4 representa la síntesis de polivinilamina, como se describe en el Ejemplo 29.

La Figura 5 representa una reacción para la desprotección de la poliamina después de la polimerización.

La Figura 6 representa una reacción de polivinilamina con cloruro de bencilo.

La Figura 7 representa un esquema de polimerización y reacción para formar un copolímero multivalente sensible a estímulos iónicos.

La Figura 8 representa un espectro de RMN para la polivinilamina modificada (PVA) del Ejemplo 35. La integración de la 1H RMN muestra un nivel de modificación de bencilo de aproximadamente un 18%.

La Figura 9 representa un espectro de RMN para la polialilamina modificada del Ejemplo 36. La integración de la 1H RMN muestra un nivel de modificación de bencilo de aproximadamente un 33%.

La Figura 10 representa un gráfico que demuestra el efecto de la dosificación del polímero para un polímero que no responde al estímulo (por ejemplo, quitosano) y un polímero que responde al estímulo (por ejemplo, polialilamina

modificada con bencilo) sobre la turbidez del concentrado. El eje X es la dosis de polímero (% en peso) y el eje Y es la turbidez del concentrado (NTU), como se describe en el Ejemplo 37.

5 La Figura 11 representa un gráfico que demuestra el efecto de la dosis de polímero en presencia y ausencia de un estímulo para un polímero sensible a estímulos de bencil polialilamina. El eje X es la dosis de polímero en % en peso, y el eje Y es la turbidez del concentrado (NTU), como se describe en el Ejemplo 38.

La Figura 12 representa un esquema típico utilizado para la purificación de biomoléculas.

La Figura 13 representa un esquema de purificación que incluye un polímero sensible a estímulos utilizado para mejorar la clarificación del cultivo celular. El polímero sensible a estímulos elimina una o más impurezas, sin embargo, el polímero no se une a la molécula objetivo deseada.

10 La Figura 14 representa un esquema de purificación que incluye un polímero sensible a estímulos utilizado para mejorar la clarificación del cultivo celular. El polímero sensible a estímulos elimina una o más impurezas mediante floculación, sin embargo, el polímero no se une a la molécula objetivo deseada y el polímero residual se elimina mediante la adición de un estímulo después de la clarificación.

15 La Figura 15 representa un esquema de purificación que incluye un polímero sensible a estímulos utilizado para mejorar la clarificación del cultivo celular. El polímero sensible a estímulos elimina una o más impurezas, sin embargo, el polímero no se une a la molécula objetivo y el polímero residual se elimina mediante una etapa de filtración adsorbente adicional después de la clarificación.

### Descripción detallada

20 La presente invención proporciona un método para separar una molécula objetivo de una o más impurezas de una muestra, de acuerdo con las reivindicaciones.

25 Los polímeros sensibles a estímulos y los métodos para usar los mismos descritos en la presente memoria son más eficientes que los descritos en la técnica anterior, ya que proporcionan un intervalo mejorado de pH para la purificación de las moléculas objetivo deseadas, que incluyen, por ejemplo, proteínas, así como la eliminación de entidades indeseables tales como impurezas, por ejemplo, proteínas de la célula huésped, ADN, ARN, lípidos, endotoxinas, aditivos de cultivo celular, células y restos celulares. En algunas realizaciones, los polímeros descritos en la presente memoria son sensibles a concentraciones bajas de sales multivalentes simples, lo que permite una escalabilidad mejorada y una conductividad reducida respecto de los polímeros sensibles a sales existentes. En diversas realizaciones, los polímeros descritos pueden eliminar eficazmente células enteras, restos celulares y otras impurezas solubles de los medios de cultivo celular. Los polímeros también pueden eliminar eficazmente las impurezas de las mezclas de proteínas que contienen una proteína de interés y una o más impurezas. Además, varios polímeros descritos en la presente memoria pueden capturar eficazmente moléculas objetivo y proteínas/productos de interés de una muestra, separándolos de una o más impurezas presentes en la muestra y aumentando la pureza de la molécula objetivo.

35 La presente invención incluye métodos para usar los polímeros descritos en la presente memoria para la purificación de moléculas objetivo, por ejemplo, proteínas terapéuticas, usando una amplia gama de condiciones.

40 Sin desear limitarse por la teoría, se contempla que los polímeros sensibles a estímulos descritos en la presente memoria pueden usarse para la unión y precipitación de una molécula objetivo deseada, por ejemplo, una proteína terapéutica o un producto deseable, o una entidad indeseada, por ejemplo, una o más impurezas que incluyen, por ejemplo, proteínas de la célula huésped, ADN, ARN, lípidos, endotoxinas, aditivos de cultivo celular, células enteras y restos celulares. En general, una molécula unida por un polímero según la presente invención se denomina biomolécula de interés, ya sea la molécula objetivo deseada o una entidad indeseada.

45 La selección de un polímero sensible a estímulos particular a usar, como se describe en la presente memoria, se determina en función de lo que se pretende unir al polímero. Por ejemplo, en el caso de una biomolécula de interés que posee una carga neta negativa a un pH superior a su pI (p. ej., células enteras, restos celulares, ADN, endotoxinas y proteínas), es deseable usar un polímero sensible a estímulos que comprende un esqueleto de polielectrolito que es catiónico (es decir, cargado positivamente). Por otro lado, en el caso de una biomolécula de interés que comprende una carga positiva neta a un pH por debajo de su pI (p. ej. proteínas), es deseable utilizar un polímero sensible a estímulos que comprenda un esqueleto de polielectrolito que sea aniónico (es decir, cargado negativamente).

50 Una carga positiva podría ser inherente al polímero en las condiciones utilizadas durante el proceso de purificación, o la carga positiva puede generarse con un cambio en el pH que hace que el polímero sensible a estímulos se cargue.

55 Un parámetro importante que afecta a la recuperación global de una biomolécula es la proporción de los grupos de modificación hidrófobos respecto de los restantes grupos cargados sin modificar del esqueleto de polielectrolito. Por ejemplo, a medida que aumenta el porcentaje de grupos hidrófobos, también lo hace la pérdida resultante de la biomolécula a través de interacciones inespecíficas. Por lo tanto, para una biomolécula dada, se puede usar una proporción específica de grupos cargados respecto de grupos hidrófobos para maximizar la recuperación de la

biomolécula. Además, un alto porcentaje de grupos hidrófobos puede limitar la solubilidad del polímero y la efectividad de los grupos cargados del esqueleto de polielectrolito.

Además, la modificación de un grupo amina cargado en el esqueleto del polielectrolito de polialilamina con cloruro de bencilo da como resultado una amina secundaria que se carga en una amplia gama de condiciones de pH. Sin embargo, dicha modificación con bencilo añade un volumen estérico al grupo amina que puede afectar a las interacciones carga-carga. Además, la modificación de un grupo cargado en un esqueleto de polielectrolito con un grupo hidrófobo puede dar como resultado una reducción del número de grupos cargados. Por ejemplo, la modificación de un grupo amina de polialilamina con cloruro de bencilo da como resultado la formación de un enlace amida que no es un grupo cargado, lo que da como resultado una reducción del número de grupos cargados en el esqueleto. Por consiguiente, una reducción del número de grupos cargados también puede afectar tanto a la solubilidad de los polímeros como a la capacidad del polímero de unirse mediante interacciones carga-carga.

Mientras que ciertos polímeros útiles en la presente invención son catiónicos y otros son aniónicos, también pueden sintetizarse polímeros híbridos, que comprenden un esqueleto de polielectrolito que es catiónico y está modificado con uno o más grupos hidrófobos y aniónicos. En el caso de tales polímeros híbridos, los grupos sin modificar del polielectrolito catiónico responden a una sal formadora de complejos, mientras que los grupos de modificación aniónicos del esqueleto pueden unirse a una biomolécula de interés que posee una carga positiva neta. Por consiguiente, la proporción de grupos catiónicos sin modificar del esqueleto de polielectrolito respecto de los grupos aniónicos e hidrófobos es importante para determinar la solubilidad y el estímulo necesario para que el polímero forme un complejo y capture la biomolécula de interés. Por ejemplo, muy pocos grupos catiónicos sin modificar del esqueleto de polielectrolito pueden dar como resultado una respuesta limitada o nula al estímulo. Mientras que muy pocos grupos aniónicos pueden limitar la capacidad de capturar una biomolécula de interés.

El nivel requerido de modificación del esqueleto de polielectrolito por grupos hidrófobos, así como el tipo y la cantidad de estímulo que se usa, puede ser hexanitrodifenol amina (véase, por ejemplo, ANALYTICAL SCIENCES, diciembre de 1987, vol. 3, p. 479). En general, un experto en la técnica estaría familiarizado con numerosas sales formadoras de complejos que se conocen en la técnica y pueden usarse como estímulo para los polímeros descritos en la presente memoria.

La cantidad de una sal formadora de complejos que se requiere para inducir la precipitación depende de factores tales como, por ejemplo, el pH, la concentración de polímero y la concentración de biomolécula de interés en una muestra. Por ejemplo, algunos polielectrolitos como la polialilamina tienen una densidad de carga que varía con el pH (nivel de protonación de amina). A medida que aumenta el pH, el nivel de densidad de carga se reduce, por lo que el grado de estímulo requerido para inducir la precipitación será diferente que a un pH más bajo o un estado de densidad de carga más alto.

En general, un polímero sensible a estímulos útil en la presente invención puede añadirse a una materia prima que contiene una molécula objetivo o una muestra que contiene una molécula objetivo, en forma de un sólido o en forma de un líquido. La concentración final de polímero es generalmente del 0,01% al 2%. En algunos métodos descritos en la presente memoria, se genera una mezcla de un polímero y una biomolécula de interés, seguido de la adición de un estímulo, por ejemplo, una sal formadora de complejos tal como un anión multivalente. La cantidad de estímulo puede depender de la concentración de polímero. Por ejemplo, una concentración de polímero del 2% requerirá una mayor cantidad de estímulo requerido para inducir la precipitación del polímero. Es importante que el estímulo se aplique en la cantidad correcta o en un ligero exceso para asegurar la precipitación completa del polímero a través de la respuesta al estímulo. Esto contrasta con la floculación del polímero, donde la sobredosis conduce a un polímero residual problemático.

La presente invención se puede usar en una variedad de esquemas de purificación. El polímero sensible a estímulos puede ser beneficioso en cualquier etapa del proceso, aunque la hexanitrodifenol amina (véase, por ejemplo, ANALYTICAL SCIENCES, DICIEMBRE DE 1987, VOL. 3, p. 479). En general, un experto en la técnica estaría familiarizado con numerosas sales formadoras de complejos que se conocen en la técnica y pueden usarse como estímulo para los polímeros descritos en la presente memoria.

La cantidad de una sal formadora de complejos que se requiere para inducir la precipitación depende de factores tales como, por ejemplo, el pH, la concentración de polímero y la concentración de biomolécula de interés en una muestra. Por ejemplo, algunos polielectrolitos como la polialilamina tienen una densidad de carga que varía con el pH (nivel de protonación de amina). A medida que aumenta el pH, el nivel de densidad de carga se reduce, por lo que el grado de estímulo requerido para inducir la precipitación será diferente que a un pH más bajo o un estado de densidad de carga más alto.

En general, un polímero sensible a estímulos según la presente invención puede añadirse a una materia prima que contiene una molécula objetivo o una muestra que contiene una molécula objetivo, en forma de un sólido o en forma de un líquido. La concentración final de polímero es generalmente del 0,01% al 2%. En algunos métodos descritos en la presente memoria, se genera una mezcla de un polímero y una biomolécula de interés, seguido de la adición de un estímulo, por ejemplo, una sal formadora de complejos tal como un anión multivalente. La cantidad de estímulo puede depender de la concentración de polímero. Por ejemplo, una concentración de polímero del 2% requerirá una mayor

cantidad de estímulo requerido para inducir la precipitación del polímero. Es importante que el estímulo se aplique en la cantidad correcta o en un ligero exceso para asegurar la precipitación completa del polímero a través de la respuesta al estímulo. Esto contrasta con la floculación del polímero, donde la sobredosis conduce a un polímero residual problemático.

5 La presente invención se puede usar en una variedad de esquemas de purificación. El polímero sensible a estímulos puede ser beneficioso en cualquier etapa del proceso, aunque el uso preferido es al comienzo del proceso durante la clarificación o durante la captura de la molécula objetivo. Se puede añadir un solo polímero o mezcla de polímeros sensibles a estímulos en una o más etapas y posteriormente precipitarlo usando uno o más estímulos. El estímulo puede aplicarse antes, durante o después de que el polímero se asocie con la biomolécula de interés (es decir, una o más impurezas o una molécula objetivo deseada). Además, el estímulo se puede aplicar antes, durante o después de la eliminación del precipitado, que generalmente está en forma sólida. El precipitado se puede eliminar posteriormente usando una o más técnicas conocidas en la técnica y/o las descritas en la presente memoria tales como, por ejemplo, filtración, sedimentación, centrifugación o cualquier otro método de separación sólido/líquido o una combinación de métodos en esquemas de separación simultánea, paralela o en serie.

15 La adición del polímero sensible a estímulos se puede lograr de varias maneras. Los medios de cultivo celular pueden ajustarse a una condición deseada antes de la adición de un polímero sensible a estímulos, por ejemplo, el ajuste (por ejemplo, reducción) del pH y/o la conductividad. El polímero sensible a estímulos se puede añadir a los medios de cultivo celular y mezclarlo. El polímero sensible a estímulos se puede añadir en un formato líquido o sólido. La disolución que contiene el polímero en sí puede formularse solo para ajustar el pH de los medios de cultivo celular a una condición deseada. Por ejemplo, el polímero sensible a estímulos se puede disolver en una disolución concentrada de ácido acético. La concentración de esta disolución de ácido acético se puede alterar en función del volumen, el estado de la disolución de fermentación y la concentración de proteína para proporcionar el ajuste del pH necesario tras la adición del polímero sensible a estímulos, para dar como resultado la concentración deseada de polímero y el pH de la disolución. El polímero sensible a estímulos se puede añadir a concentraciones donde se produce la floculación espontánea, típicamente en el intervalo del 0,01 al 0,1% en peso de polímero o 0,01 al 0,5% en peso de polímero, dependiendo del tipo y porcentaje de sólidos, de modo que la disolución se vuelve turbia y comienza a formar un precipitado. Alternativamente, el polímero sensible a estímulos se puede añadir a concentraciones donde no se produce la floculación espontánea, pero sí se produce una asociación polímero-biomolécula, por ejemplo, típicamente, en el intervalo del 0,5% al 2% en peso de polímero, y la disolución podría ser clara o ligeramente turbia o más turbia que la disolución original. Además, el polímero sensible a estímulos se puede añadir a concentraciones donde se produce una mezcla de floculación espontánea y asociación polímero-biomolécula.

Aunque el uso de un estímulo en un esquema de purificación es más deseable, ya que alivia algunos de los problemas asociados con la sobredosis del polímero, por ejemplo, como en el caso de los procesos de floculación, se contempla que también pueden usarse los polímeros descritos en la presente memoria como floculantes.

35 En un esquema de purificación ejemplar, se añade un polímero sensible a estímulos al cultivo celular después de haber completado la fermentación, y se formula el polímero para unirse a una biomolécula de interés que no es la molécula objetivo deseada. En dicho método, se añade un polímero sensible a estímulos al cultivo celular en un primer conjunto de condiciones, por ejemplo, condiciones que pueden ajustarse antes, durante o después de la adición del polímero que se une a la biomolécula de interés. Después de añadir el polímero sensible a estímulos en el primer conjunto de condiciones, se añade un estímulo en un segundo conjunto de condiciones, generando así un precipitado que incluye la biomolécula de interés (por ejemplo, una o más impurezas tales como células, restos celulares, proteínas de la célula huésped, ADN, endotoxinas y virus). El precipitado sólido se puede eliminar posteriormente por centrifugación y/o filtración, dando como resultado un líquido de cultivo celular clarificado. El líquido de cultivo celular clarificado resultante puede pasarse posteriormente a través de una etapa de captura usando un medio de cromatografía para unir la molécula objetivo deseada. La molécula objetivo puede eluirse posteriormente de la etapa de captura. Por consiguiente, en algunos casos, al usar un polímero sensible a estímulos que permite la eliminación de una o más impurezas en la etapa de clarificación, el número de etapas adicionales puede reducirse/eliminarse o modificarse.

50 En algunas realizaciones, se añade un polímero sensible a estímulos al cultivo celular en condiciones en las que el polímero se une a una biomolécula de interés que no es la molécula objetivo. Después de mezclar bien el polímero sensible a estímulos en las condiciones de disolución deseadas, se deja formar un floculado que incluye la biomolécula de interés. El sólido que contiene la biomolécula de interés se elimina mediante clarificación primaria. El líquido de cultivo celular resultante se recoge y se aplica un estímulo para precipitar el polímero residual. El polímero residual precipitado se elimina posteriormente mediante clarificación secundaria. La disolución de cultivo celular clarificada resultante se hace pasar a través de una etapa de captura usando un medio de cromatografía para unir la molécula objetivo. Puede ser posible eliminar el polímero residual usando la adición de un estímulo en cualquiera de las etapas de purificación después de la clarificación primaria. Además, puede ser posible añadir un estímulo para eliminar el polímero residual en cualquier etapa, o añadir uno o más estímulos varias veces a lo largo del proceso.

60 En otro esquema de purificación, se añade un polímero sensible a estímulos al líquido de cultivo celular después de que haber completado la fermentación en condiciones adecuadas para que el polímero se una a una o más impurezas, de modo que el polímero no se una a la molécula objetivo. Después de mezclar bien el polímero sensible a estímulos

en las condiciones de disolución deseadas, se añade un estímulo que forma un precipitado sólido con una o más impurezas. El precipitado sólido se elimina por centrifugación y/o filtración. La disolución de cultivo celular clarificada resultante se hace pasar a través de un filtro que es capaz de unirse al polímero sensible a estímulos. Un experto habitual en la técnica puede seleccionar/identificar fácilmente un filtro que pueda unirse al polímero sensible a estímulos. Por ejemplo, se puede proporcionar un filtro con propiedades similares a la biomolécula de interés que se unirá al polímero. Alternativamente, se puede usar un filtro que posee un grupo cargado que tiene la misma carga que la biomolécula de interés y una carga opuesta a la del polímero sensible a estímulos.

También se pueden usar membranas, lechos compactos o filtros para eliminar un polímero de la disolución. Por ejemplo, podría usarse una membrana aniónica que contiene grupos de ácido sulfónico para eliminar un polímero sensible a estímulos de poliamina. Además, se puede usar un filtro con propiedades de unión similares al estímulo utilizado para precipitar el polímero. Si el estímulo es un anión multivalente, proporcionar un filtro con una superficie que contenga aniones multivalentes puede eliminar el polímero de la disolución. Por ejemplo, una membrana modificada con poli(fosfato de vinilo) podría unirse a las poliaminas de la misma manera que los iones de fosfato pueden formar complejos con las poliaminas, para inducir la precipitación. Además, podrían usarse esferas (por ejemplo, de polimetacrilato) modificadas con poli(fosfato de vinilo). En algunas realizaciones, después de la filtración de la disolución con un filtro que puede eliminar el polímero sensible a estímulos, la disolución resultante se hace pasar a través de una etapa de captura usando un medio de cromatografía para unir la biomolécula objetivo. Es posible eliminar el polímero usando un medio de cromatografía, filtro de profundidad u otro material poroso que pueda unirse al polímero sensible a estímulos. También es posible eliminar el polímero con medios de adsorción en una sola etapa o más de una o múltiples etapas. Además, es posible eliminar el polímero mediante medios de adsorción en cualquier etapa después de la adición del polímero a la mezcla.

Se anticipa que la presente invención puede usarse en muchas variaciones de los esquemas de purificación descritos en la presente memoria. El polímero sensible a estímulos se puede usar para sustituir o mejorar las etapas de clarificación y captura. Por ejemplo, se podrían usar dos polímeros distintos que respondiesen al estímulo; el primer polímero que se uniese a una o más impurezas pero que no se uniese a la molécula objetivo, y un segundo polímero que se uniese a la molécula objetivo. Estos dos polímeros podrían aplicarse en etapas distintas o en una sola etapa. Del mismo modo, se podría usar un único polímero que tuviese grupos funcionales capaces de unirse a la molécula objetivo y un esqueleto de polielectrolito capaz de unirse a una o más impurezas. El polímero individual podría unirse a la molécula objetivo y una o más impurezas en una sola etapa o en varias etapas. La elución posterior de la molécula objetivo del polímero puede darse después de varias adiciones diferentes de precipitación/estímulo o etapas de lavado. El polímero sensible a estímulos puede añadirse después de la etapa de captura y usarse para clarificar sólidos suspendidos e impurezas que resultan de la inactivación de virus u otras etapas después de la etapa de captura. El polímero sensible a estímulos también puede sustituir o mejorar las etapas de refinado.

En algunas realizaciones, se incluye una etapa de inactivación de virus (es decir, exposición de la disolución a pH bajo, tensioactivos o calor). Las condiciones de la disolución pueden ajustarse y la muestra procesarse a través de una serie de etapas de refinado (es decir, uno o más de intercambio iónico, interacción hidrófoba, modo mixto y otros). La disolución puede entonces someterse a una serie de etapas de filtración, que incluyen filtración de virus y ultrafiltración o diafiltración.

Para que la presente descripción pueda entenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

#### I. Definiciones

Los términos "estímulo" o "estímulos", como se usan indistintamente en la presente memoria, se refieren a un cambio físico o químico en el entorno que da como resultado una respuesta de un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria.

Por consiguiente, la presente invención usa polímeros nuevos que responden a un estímulo, y cuyo estímulo da como resultado un cambio en la solubilidad del polímero. Los ejemplos de estímulos a los que responden uno o más polímeros descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, cambios en la temperatura, cambios en la conductividad y/o cambios en el pH. En algunas realizaciones, un estímulo comprende la adición de un agente complejante o una sal formadora de complejos a una muestra. En diversas realizaciones, generalmente se añade un estímulo después de la adición de un polímero a una muestra. Aunque el estímulo también se puede añadir durante o antes de la adición de un polímero a una muestra.

El término "polímero", como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula formada mediante enlaces covalentes de dos o más unidades de monómero. Estas unidades de monómero pueden ser sintéticas o darse en la naturaleza. Los polímeros formados por las unidades repetitivas pueden ser lineales o ramificados. Los ejemplos de polímeros incluyen, entre otros, polietilenglicol, polipropilenglicol, polietileno, polialilamina, poli(alcohol vinílico), poliestireno y copolímeros (por ejemplo, poliestireno-co-polipiridina, poli(ácido acrílico-co-metacrilato de metilo), Pluronic, PF68, etc.). De acuerdo con la presente invención, los polímeros comprenden un esqueleto de polielectrolito. También se describen en la presente memoria copolímeros, que pueden usarse en los métodos de acuerdo con la presente invención, en los que los copolímeros responden a un estímulo. En general, se entiende que,

en el caso de los polímeros, las unidades monoméricas son del mismo tipo, mientras que un copolímero generalmente tendrá diferentes tipos de unidades monoméricas.

El término "polímero sensible a estímulos", como se usa en la presente memoria, es un polímero o copolímero que exhibe un cambio en una propiedad física y/o química después de la adición de un estímulo. Una respuesta típica a un estímulo es un cambio en la solubilidad del polímero. Por ejemplo, el polímero poli(N-isopropilacrilamida) es soluble en agua a temperaturas inferiores a aproximadamente 35 °C, pero se vuelve insoluble en agua a temperaturas de aproximadamente 35 °C. En una realización particular, un polímero sensible a estímulos es una polialilamina o un polímero de polivinilamina que responde a un estímulo de ion multivalente (por ejemplo, un estímulo de fosfato).

El término "esqueleto de polielectrolito", como se usa en la presente memoria, se refiere a un polímero que contiene carbono que comprende dos o más unidades monoméricas, donde al menos el 50% de las unidades, o al menos el 55% de las unidades, o al menos el 60% de las unidades, o al menos el 65% de las unidades, o al menos el 70% de las unidades, o al menos el 75% de las unidades, o al menos el 80% de las unidades, o al menos el 85% de las unidades, o al menos el 90% de las unidades, o al menos el 95% de las unidades, contienen una funcionalidad cargada. En otras palabras, al menos el 50% de las unidades monoméricas incluyen un grupo cargado que forma parte de la unidad. En algunas realizaciones, un esqueleto de polielectrolito descrito en la presente memoria contiene al menos dos o más unidades monoméricas, donde cada una de las unidades contiene una funcionalidad cargada. En el caso del esqueleto de polielectrolito de los polímeros, en el que cada una de las unidades monoméricas contiene una funcionalidad cargada, dichos polímeros pueden denominarse "polielectrolitos continuos". Los polielectrolitos ejemplares incluyen, pero sin limitación, polialilamina, polivinilamina, poli(ácido acrílico), polietilenimina, quitosano y poli(ácido vinilfosfórico). También se contempla que una o más entidades, que son diferentes de las unidades monoméricas, pueden estar unidas al esqueleto de polielectrolito.

El término "grupo hidrófobo", como se usa en la presente memoria, se refiere a una entidad o grupo químico apolar, que tiene poca o ninguna afinidad por el agua. Los grupos hidrófobos ejemplares incluyen, pero sin limitación, grupos fenilo, grupos butilo terciario, hidrocarburos cíclicos, hidrocarburos alifáticos policíclicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos e hidrocarburos de cadena corta como los grupos hexilo y octilo. En una realización particular, el grupo hidrófobo es un grupo fenilo. El grupo hidrófobo también puede ser distinto de un hidrocarburo y contener heteroátomos tales como nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, etc. En diversas realizaciones de acuerdo con la presente invención, se usan polímeros sensibles a estímulos, que comprenden un esqueleto de polielectrolito que tiene uno o más grupos hidrófobos unidos a un grupo cargado en el esqueleto. Sin desear limitarse por la teoría, se entiende que el número de grupos hidrófobos unidos al esqueleto de polielectrolito es importante para alterar la solubilidad del polímero, mejorando así la capacidad de respuesta al estímulo del polímero. Sin embargo, puede ser indeseable tener una serie de grupos hidrófobos que hagan que el polímero sea insoluble en agua sin un estímulo.

El porcentaje de grupos cargados en un esqueleto de polielectrolito que se modifica con un grupo hidrófobo se denomina generalmente "porcentaje de modificación hidrófoba" del polímero. Por consiguiente, en diversas realizaciones, el porcentaje de modificación hidrófoba es importante, y varía del 1% al 85% o del 5% al 85%. En consecuencia, el porcentaje de modificación hidrófoba puede ser al menos del 1%, o al menos 2%, o al menos 3%, o al menos 4% o al menos 5%, o al menos 6%, o al menos 7%, o al menos 8%, o al menos 9%, o al menos 10%, o al menos 15%, o al menos 20%, o al menos 25%, o al menos 30%, o al menos 35%, o al menos 40%, o al menos 45%, o al menos 50%, o al menos 55%, o al menos 60%, o al menos 65%, o al menos 70%, o al menos 75%, o al menos 80%, o al menos 85%.

El término "porcentaje de modificación hidrófoba", como se usa en la presente memoria, generalmente se refiere a la proporción de grupos cargados de polielectrolito sin modificar respecto de los grupos cargados de polielectrolito modificados con grupos hidrófobos, como un porcentaje de las unidades monoméricas de polielectrolito totales en un esqueleto de polímero de polielectrolito.

En algunas realizaciones, un grupo hidrófobo unido a un esqueleto de polielectrolito tiene además un grupo cargado unido al grupo hidrófobo, que es una entidad distinta del grupo cargado del esqueleto.

Como se usa en la presente memoria, el término "alquilo" generalmente se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada. Las cadenas de hidrocarburos de cadena lineal o de cadena ramificada se refieren a cualquier compuesto que contiene carbono acíclico sustituido o sin sustituir, que incluye, por ejemplo, alcanos, alquenos y alquinos. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen alquilo inferior, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo o isohexilo; alquilo superior, por ejemplo, n-heptilo, n-octilo, iso-octilo, nonilo, decilo y similares; alquilenos inferior, por ejemplo, etileno, propileno, propileno, butileno, butadieno, penteno, n-hexeno o isohexeno; y alquilenos superior, por ejemplo, n-hepteno, n-octeno, iso-octeno, noneno, deceno y similares. Un experto habitual en la técnica estaría familiarizado con numerosos grupos alquilo lineales, así como ramificados, que están abarcados por la presente invención.

Además, dichos grupos alquilo también pueden contener diversos sustituyentes en los que uno o más átomos de hidrógeno se sustituyen por un grupo funcional. Los ejemplos de grupos funcionales incluyen, pero sin limitación, grupos carboxílicos, sulfónicos, fosfónicos y similares. Como se usa en la presente memoria, el término "alquenilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada, donde al menos uno de los enlaces carbono-carbono es un

doble enlace carbono-carbono.

Como se usa en la presente memoria, el término "aralquilo" se refiere a un grupo alquilo que está sustituido en el extremo con al menos un grupo arilo.

5 Como se usa en la presente memoria, el término "aralquenilo" se refiere a un grupo alquenilo que está sustituido en el extremo con al menos un grupo arilo.

Como se usa en la presente memoria, el término "arilo" se refiere a un anillo de hidrocarburo que contiene un sistema de dobles enlaces conjugados, que a menudo comprende al menos seis  $n$  electrones ( $\pi$ ). Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo, anisilo, toluilo y xilenilo.

10 Como se usa en la presente memoria, el término "fluorocarbono" se refiere a una cadena de carbono lineal o ramificada en la que uno o más átomos de hidrógeno se sustituyen por un grupo flúor. La cadena de fluorocarbono de cadena lineal o ramificada generalmente se refiere a cualquier compuesto que contiene carbono acíclico sustituido o sin sustituir, que incluye, por ejemplo, alcanos, alquenos y alquinos. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen alquilo inferior, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, iso-propilo, *n*-butilo, iso-butilo, terc-butilo o iso-hexilo; alquilo superior, por ejemplo, *n*-heptilo, *n*-octilo, iso-octilo, nonilo, decilo y similares; alquileo inferior, por ejemplo, etileno, propileno, propileno, butileno, butadieno, penteno, *n*-hexeno o iso-hexeno; y alquileo superior, por ejemplo, *n*-hepteno, *n*-octeno, iso-octeno, noneno, deceno y similares. En general, se entiende que un experto habitual en la técnica estaría familiarizado con numerosos grupos alquilo lineales, así como ramificados, que están dentro del alcance de la presente invención. Además, dichos grupos alquilo también pueden contener diversos sustituyentes en los que uno o más átomos de hidrógeno o uno o más átomos de flúor se sustituyen por un grupo funcional. Los ejemplos de grupos funcionales incluyen, pero sin limitación, grupos carboxílicos, sulfónicos, fosfónicos y similares.

20 El término "grupo funcional", como se usa en la presente memoria, es un grupo que confiere una funcionalidad adicional a un polímero descrito en la presente memoria. En otras palabras, un grupo funcional es un grupo que es distinto de un grupo hidrófobo, y también está unido al esqueleto de polielectrolito, por ejemplo, a un grupo cargado del esqueleto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un grupo funcional puede ser un ligando para cambiar las propiedades de unión del polímero, por ejemplo, grupos ácido carboxílico, ácido sulfónico, sulfato, amina primaria, amina cuaternaria y dietilamino. El grupo funcional también puede alterar propiedades o proporcionar propiedades deseadas adicionales al polímero tales como, por ejemplo, alterar una respuesta al estímulo o hacer que el polímero responda a un segundo estímulo. Los ejemplos de grupos funcionales para alterar el comportamiento en respuesta al estímulo incluyen, pero sin limitación, el grupo ácido carboxílico (sensible al pH), grupo piridina (sensible al pH) y grupo *N*-isopropilacrilamido (respuesta a la temperatura).

25 El término "ligando", como se usa en la presente memoria, generalmente se refiere a una entidad que proporciona una capacidad de unión específica hacia otra entidad. Los ejemplos de "ligandos" incluyen, pero sin limitación, grupos de intercambio iónico, grupos de bioafinidad o bioespecíficos, grupos hidrófobos, grupos de interacción tiofílica, quelatos o grupos quelantes, grupos que tienen las llamadas interacciones  $\pi$ - $\pi$  con compuestos objetivo, grupos de formación de enlaces de hidrógeno, y grupos hidrófilos.

30 El término "floculación", como se usa en la presente memoria, se refiere a la adición de un floculante, tal como un polímero descrito en la presente memoria, a una disolución para eliminar una o más impurezas insolubles suspendidas o solubles. El polímero debe añadirse a la disolución a una concentración que permita la formación espontánea de agregados insolubles que pueden eliminarse de la disolución mediante los métodos típicos de separación sólido-líquido.

35 Los términos "composición", "disolución" o "muestra", como se usan en la presente memoria, se refieren a una mezcla de una molécula objetivo o un producto deseado a purificar usando uno o más polímeros sensibles a estímulos descritos en la presente memoria junto con una o más entidades indeseables o impurezas. En algunas realizaciones, la muestra comprende una materia prima o medio de cultivo celular en el que se secreta una molécula objetivo o un producto deseado. En algunas realizaciones, la muestra comprende una molécula objetivo (por ejemplo, una proteína terapéutica o un anticuerpo) junto con una o más impurezas (por ejemplo, proteínas de la célula huésped, ADN, ARN, lípidos, aditivos de cultivo celular, células y restos celulares). En algunas realizaciones, la muestra comprende una molécula objetivo de interés que se secreta en los medios de cultivo celular. En algunas realizaciones, una muestra de la que se va a purificar una molécula objetivo usando uno o más polímeros sensibles a estímulos descritos en la presente memoria se "purifica parcialmente" antes de poner en contacto la muestra con un polímero sensible a estímulos. La purificación parcial se puede lograr, por ejemplo, sometiendo la muestra a una o más etapas de purificación, tales como, por ejemplo, una o más etapas de cromatografía distintas de afinidad. La molécula objetivo puede separarse de una o más entidades o impurezas indeseables precipitando la o las impurezas o precipitando la molécula objetivo.

55 En algunas realizaciones, un polímero sensible a estímulos útil en la presente invención se une a una biomolécula de interés que es ella misma una molécula o producto objetivo (por ejemplo, una proteína o polipéptido objetivo), en un primer conjunto de condiciones, y precipita la molécula objetivo en un segundo conjunto de condiciones, por ejemplo, al añadir un estímulo a la muestra. En otras realizaciones, una biomolécula de interés es una molécula distinta de una

- molécula objetivo. En otras palabras, la biomolécula de interés unida por un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria puede ser una molécula que no se desea que esté asociada con una molécula objetivo de una muestra. Sin desear limitarse por la teoría, se contempla que, en algunas realizaciones, un polímero sensible a estímulos útil en la presente invención se une y precipita una o más proteínas de la célula huésped, ADN, células completas, restos celulares, virus, endotoxinas y/o aditivos de cultivo celular, tras la adición de un estímulo. Por consiguiente, una molécula objetivo (por ejemplo, una proteína o polipéptido objetivo) podría purificarse usando un polímero descrito en la presente memoria precipitando la molécula objetivo deseada o precipitando una o más entidades indeseables (por ejemplo, una o más impurezas) que pueden estar presentes en una muestra que contiene la molécula objetivo deseada.
- 5 Los términos "precipitar" o "precipitación", como se usan en la presente memoria, se refieren a la alteración de un polímero unido (p. ej., en un complejo con una biomolécula de interés) o sin unir de un estado acuoso y/o soluble a un estado no acuoso y/o insoluble.
- El término "biomolécula de interés", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier molécula que se une y precipita con un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria. Por ejemplo, la biomolécula de interés puede ser una molécula objetivo deseada, como, por ejemplo, un producto o polipéptido de interés deseado (por ejemplo, un anticuerpo), o puede ser una entidad indeseable, que debe eliminarse de una muestra que contiene la molécula objetivo deseada. Dichas entidades indeseables incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, una o más impurezas seleccionadas de proteínas de la célula huésped, ADN, ARN, agregados de proteínas, aditivos de cultivo celular, virus, endotoxinas, células enteras y restos celulares.
- 15 Los términos "molécula objetivo", "biomolécula objetivo", "molécula objetivo deseada" y "biomolécula objetivo deseada", tal como se usan de manera intercambiable en la presente memoria, generalmente se refieren a un polipéptido o producto de interés, que se desea purificar o separar de una o más entidades indeseables, por ejemplo, una o más impurezas, que pueden estar presentes en una muestra que contiene el polipéptido o el producto de interés. Los términos "proteína de interés", "polipéptido objetivo", "polipéptido de interés" y "proteína objetivo", tal como se usan de manera intercambiable en la presente memoria, generalmente se refieren a una proteína o polipéptido terapéutico, que incluye, pero sin limitación, un anticuerpo que se va a purificar usando un polímero sensible a estímulos.
- 20 Como se usa en la presente memoria de manera intercambiable, el término "polipéptido" o "proteína" generalmente se refiere a péptidos y proteínas que tienen más de aproximadamente diez aminoácidos. En algunas realizaciones, un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria se usa para separar una proteína o polipéptido de una o más entidades indeseables presentes en una muestra junto con la proteína o polipéptido. En algunas realizaciones, la o las entidades son una o más impurezas que pueden estar presentes en una muestra junto con la proteína o polipéptido a purificar. Como se discutió anteriormente, en algunas realizaciones, un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria se une y precipita específicamente una proteína o polipéptido de interés tras la adición de un estímulo a la muestra. En otras realizaciones, un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria se une y precipita una entidad distinta de la proteína o polipéptido de interés, tal como, por ejemplo, proteínas de la célula huésped, ADN, virus, células completas, restos celulares y aditivos de cultivo celular, tras la adición de un estímulo.
- 30 En algunas realizaciones, una proteína o polipéptido que se purifica usando un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria es una proteína de mamífero, por ejemplo, una proteína terapéutica o una proteína que puede usarse en terapia. Las proteínas ejemplares incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, renina; una hormona del crecimiento, que incluye la hormona del crecimiento humano y la hormona del crecimiento bovina; factor liberador de hormona del crecimiento, hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimulante del foliculo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como el factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor von Willebrand; factores anticoagulantes como la proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; 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, factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalina; RANTES (expresado y secretado por células T normales, y regulado por activación); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una albúmina sérica tal como albúmina sérica humana; sustancia inhibidora Mulleriana; cadena A de relaxina; cadena  $\beta$  de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, como la beta-lactamasa; Dnasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina activa; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; Proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico como el factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como  $\alpha$ -FGF y  $\beta$ -FGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, que incluye TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF  $\beta$ 4 o TGF- $\beta$ 5; factor de crecimiento similar a insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a insulina (IGFBPs); proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 y CD40; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSFs), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (ILs), por ejemplo, IL-1 a IL-

10; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de la membrana superficial; factor de aceleración de la descomposición; antígeno viral tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del SIDA; proteínas de transporte; receptores de guiado; adreínas; proteínas reguladoras, integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como el receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente.

Además, en algunas realizaciones, una proteína o polipéptido purificado usando un polímero inteligente es un anticuerpo, fragmento funcional o variante del mismo. En algunas realizaciones, una proteína de interés es una proteína recombinante que contiene una región Fc de una inmunoglobulina.

Los términos "inmunoglobulina", "Ig" o "anticuerpo" (usados de manera intercambiable en la presente memoria) se refieren a una proteína que tiene una estructura básica de cuatro cadenas polipeptídicas que consta de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, y dichas cadenas se estabilizan, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro intercatenarios, que tiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno. El término "inmunoglobulina de cadena sencilla" o "anticuerpo de cadena sencilla" (usado indistintamente en la presente memoria) se refiere a una proteína que tiene una estructura de dos cadenas polipeptídicas que consiste en una cadena pesada y una cadena ligera, estabilizándose dichas cadenas, por ejemplo, mediante enlaces peptídicos intercatenarios, 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 (por ejemplo, que comprenden de 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, mediante una lámina  $\beta$  plegada y/o un enlace disulfuro intracatenario. Los dominios se denominan en la presente memoria adicionalmente como "constantes" o "variables", basándose en la falta relativa de variación de secuencias dentro de los dominios de varios miembros de la clase en el caso de un dominio "constante", o en la variación significativa dentro de los dominios de varios miembros de la clase en el caso de un dominio "variable". Los "dominios" de los anticuerpos o polipéptidos a menudo se denominan indistintamente en la técnica como "regiones" de los anticuerpos o polipéptidos. Los dominios "constantes" de las cadenas ligeras de los anticuerpos se denominan indistintamente "regiones constantes de la cadena ligera", "dominios constantes de la cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" de las cadenas pesadas de los anticuerpos se denominan indistintamente "regiones constantes de la cadena pesada", "dominios constantes de la cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH". Los dominios "variables" de las cadenas ligeras de los anticuerpos se denominan indistintamente "regiones variables de la cadena ligera", "dominios variables de la cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL". Los dominios "variables" de las cadenas pesadas de los anticuerpos se denominan indistintamente "regiones variables de la cadena pesada", "dominios variables de la cadena pesada", regiones "VH" o dominios "VH".

Las inmunoglobulinas o los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden existir en forma monomérica o polimérica, por ejemplo, los anticuerpos IgM que existen en forma pentamérica y/o los anticuerpos IgA que existen en forma monomérica, dimérica o multimérica. Las inmunoglobulinas o los anticuerpos también pueden incluir anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre que retengan o se modifiquen para comprender un dominio de unión específico del ligando. El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos residuos de aminoácidos que un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos pueden obtenerse mediante tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos también se pueden obtener por medios recombinantes. Cuando se producen de forma recombinante, los fragmentos pueden expresarse solos o como parte de una proteína más grande llamada proteína de fusión. Los fragmentos ejemplares incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, Fc y/o Fv. Las proteínas de fusión ejemplares incluyen las proteínas de fusión Fc.

Generalmente, una inmunoglobulina o anticuerpo se dirige contra un "antígeno" de interés. Preferiblemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante, y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como los antígenos de glucolípidos asociados a tumores; véase la pat. de EE.UU. N° 5.091.178). Cuando el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembrana (por ejemplo, un receptor) o un ligando, como un factor de crecimiento.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que constituyen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigidos contra un solo sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales), que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que requiera la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature 256:495 (1975), o pueden elaborarse mediante métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., la pat. de EE.UU. N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales pueden incluir además anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (pat. de EE.UU. N° 4.816.567 y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

El término "región hipervariable", cuando se usa en la presente memoria, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (es decir, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda Md. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Los residuos "estructurales" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable como se define en la presente memoria.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los residuos de la región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como el ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

En algunas realizaciones, un anticuerpo que se separa o purifica usando un polímero sensible a estímulos es un anticuerpo terapéutico. Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos incluyen, por ejemplo, trastuzumab (HERCEPTIN™, Genentech, Inc., Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289; pat. de EE.UU. N° 5.725.856); anticuerpos anti-CD20 tales como anti-CD20 quimérico "C2B8", pat. de EE.UU. N° 5.736.137; rituximab (RITUXAN™), ocrelizumab, una variante quimérica o humanizada del anticuerpo 2H7 (pat. de EE.UU. N° 5.721.108; documento WO 04/056312) o tositumomab (BEXXAR™); anti-IL-8 (St John et al., (1993) Chest, 103:932, y documento WO 95/23865); anticuerpos anti-VEGF que incluyen anticuerpos anti-VEGF humanizados y/o madurados por afinidad tales como el anticuerpo humanizado anti-VHGF huA4.6.1 bevacizumab (AVASTIN™, Genentech, Inc., Kim et al. (1992) Growth Factors 7:53-64, documento WO 96/30046, documento WO 98/45331); anticuerpos anti-PSCA (documento WO 01/40309); anticuerpos anti-CD40, que incluyen S2C6 y variantes humanizadas de los mismos (documento WO 00/75348), anti-CD11a (pat. de EE.UU. N° 5.622.700; documento WO 98/23761; Steppe et al (1991) Transplant Intl. 4:3-7; Hourmant et al (1994) Transplantation 58:377-380); anti-IgE (Presta et al (1993) J. Immunol. 151:2623-2632; documento WO 95/19181); anti-CD18 (pat. de EE.UU. N° 5.622.708; documento WO 97/26912); anti-IgE, que incluye E25, E26 y E27 (pat. de EE.UU. N° 5.714.338; pat. de EE.UU. N° 5.091.313; documento WO 93/04173; pat. de EE.UU. N° 5.714.338); anticuerpo anti-receptor de Apo-2 (documento WO 98/51793); anticuerpos anti-TNF-alfa que incluyen cA2 (REMICADE™), CDP571 y MAK-195 (pat. de EE.UU. N° 5.672.347; Lorenz et al (1996) J. Immunol. 156 (4): 1646-1653; Dhainaut et al. (1995) Crit. Care Med. 23 (9): 1461-1469); Factor anti-tejido (TF) (EP 0 420 937 B1); integrina alfa 4 beta 7 antihumana (documento WO 98/06248); anticuerpo 225 anti-EGFR, quimerizado o humanizado (documento WO 96/40210); anticuerpos anti-CD3 tales como OKT3 (pat. de EE.UU. N° 4.515.893); anticuerpos anti-CD25 o anti-tac tales como CHI-621 SIMULECT™ y ZENAPAX™ (pat. de EE.UU. N° 5.693.762); anticuerpos anti-CD4 como el anticuerpo cM-7412 (Choy et al (1996) Arthritis Rheum 39 (1): 52-56); anticuerpos anti-CD52 como CAMPATH-1H (Riechmann et al (1988) Nature 332:323-337); anticuerpos anti-receptor de Fc tales como el anticuerpo M22 dirigido contra Fc gamma RI como en Graziano et al (1995) J. Immunol. 155 (10): 4996-5002; anticuerpos anti-antígeno carcinoembrionario (CEA) como hMN-14 (Sharkey et al (1995) Cancer Res. 55 (23 Supl): 5935s-5945s; anticuerpos dirigidos contra las células epiteliales de la mama, incluidos huBrE-3, hu-Mc 3 y CHL6 (Ceriani et al (1995) Cancer Res. 55 (23): 5852s-5856s; y Richman et al (1995) Cancer Res. 55 (23 Supl): 5916s-5920s); anticuerpos que se unen a células de carcinoma de colon como C242 (Litton et al. (1996) Eur J. Immunol. 26 (1): 1-9); anticuerpos anti-CD38, por ejemplo, AT 13/5 (Ellis et al (1995) J. Immunol. 155 (2): 925-937); anticuerpo anti-CD33 como Hu M195 (Jurcic et al (1995) Cancer Res 55 (23 Supl): 5908s-5910s y CMA-676 o CDP771; anticuerpos anti-CD22 como LL2 o LymphoCide (Juweid et al (1995) Cancer Res 55 (23 Supl): 5899s-5907s); anticuerpos anti-EpCAM como 17-1A (PANOREX™); anticuerpos anti-Gpl-Ib/IIIa como abciximab o c7E3 Fab (REOPRO™); anticuerpos anti-RSV como

5 como MEDI-493 (SYNAGIS™), anticuerpos anti-CMV como PROTOVIR™; anticuerpos anti-VIH tales como PRO542; anticuerpos antihepatitis tales como el anticuerpo anti-Hep B OSTAVIR™; anticuerpo anti-CA 125 OvaRex; anticuerpo BEC2 anti-epítipo GD3 idiótipo; anticuerpo anti-alfa v beta3 VITAXIN™; anticuerpo anti-carcinoma de células renales humanas tal como ch-G250; ING-1; anticuerpo anti-humano 17-1A (3622W94); anticuerpo anti-tumor colorrectal humano (A33); anticuerpo anti-melanoma humano R24 dirigido contra gangliósido GD3; anti-carcinoma de células escamosas humanas (SF-25); y anticuerpos anti-antígeno leucocitario humano (HLA) tales como Smart ID10 y el anticuerpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1).

10 Los términos "contaminante", "impureza" y "restos", como se usan indistintamente en la presente memoria, se refieren a cualquier material exógeno u objetable, incluida una macromolécula biológica como un ADN, un ARN, una o más proteínas de la célula huésped (HCPs o CHOPs), endotoxinas, virus, lípidos y uno o más aditivos que pueden estar presentes en una muestra que contiene una proteína o polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo) que se separa de una o más de las moléculas exógenas u objetables usando un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria se une y precipita una proteína o polipéptido de interés de una muestra que contiene la proteína o polipéptido de interés y una o más impurezas. En otra realización, un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria se une y precipita una o más impurezas, separando así el polipéptido o la proteína de interés de una o más impurezas.

15 Los términos "proteína de células de ovario de hámster chino" y "CHOP", como se usan indistintamente en la presente memoria, se refieren a una mezcla de proteínas de células huésped ("HCP") derivadas de un cultivo de células de ovario de hámster chino ("CHO"). La HCP o CHOP generalmente está presente como una impureza en un medio de cultivo celular o lisado (por ejemplo, un líquido de cultivo celular recogido que contiene una proteína o polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo o inmunoadhesina expresado en una célula CHO): generalmente, la cantidad de CHOP presente en una mezcla que comprende una proteína de interés proporciona una medida del grado de pureza de la proteína de interés. Por lo general, la cantidad de CHOP en una mezcla de proteínas se expresa en partes por millón respecto de la cantidad de proteína de interés en la mezcla.

20 Se entiende que cuando la célula huésped es otro tipo de célula de mamífero, una E. coli, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula vegetal, HCP se refiere a las proteínas, además de la proteína objetivo, que se encuentran en un lisado de la célula huésped.

25 El término "aditivo de cultivo celular", como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula (por ejemplo, un aditivo no proteico), que se añade a un proceso de cultivo celular para facilitar o mejorar el cultivo celular o el proceso de fermentación. En algunas realizaciones, un polímero sensible a estímulos, como se describe en la presente memoria, se une y precipita uno o más aditivos de cultivo celular. Los aditivos de cultivo celular ejemplares incluyen agentes antiespumantes, antibióticos, colorantes y nutrientes.

30 El término "partes por millón" o "ppm", como se usa indistintamente en la presente memoria, se refiere a una medida de pureza de una molécula objetivo deseada (por ejemplo, una proteína o anticuerpo objetivo) purificada usando un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria. En consecuencia, esta medida se puede utilizar para medir la cantidad de una molécula objetivo presente después del proceso de purificación o para medir la cantidad de una entidad indeseada. En algunas realizaciones, las unidades "ppm" se usan en la presente memoria para referirse a la cantidad de impureza en una disolución, por ejemplo, HCP o CHOP, en nanogramos/mililitro de proteína de interés en miligramos/mililitro (es decir, CHOP ppm = (CHOP ng/ml)/(proteína de interés mg/ml)). Cuando las proteínas se secan (p. ej., mediante liofilización), ppm se refiere a (CHOP ng)/(proteína de interés mg)).

35 Los términos "aislar", "purificar" y "separar" se usan indistintamente en la presente memoria, en el contexto de purificar una molécula objetivo (por ejemplo, un polipéptido o proteína de interés) de una composición o muestra que comprende la molécula objetivo y una o más impurezas, usando un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, el grado de pureza de la molécula objetivo en una muestra aumenta al eliminar (total o parcialmente) una o más impurezas de la muestra usando un polímero sensible a estímulos, como se describe en la presente memoria. En otra realización, el grado de pureza de la molécula objetivo en una muestra se incrementa precipitando la molécula objetivo de una o más impurezas en la muestra.

40 En algunas realizaciones, un proceso de purificación emplea adicionalmente una o más "etapas de cromatografía". Típicamente, estas etapas pueden llevarse a cabo, si es necesario, después de la separación de una molécula objetivo de una o más entidades indeseadas usando un polímero sensible a estímulos.

45 En algunas realizaciones, una "etapa de purificación" para aislar, separar o purificar un polipéptido o proteína de interés usando un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria, puede ser parte de un proceso de purificación global que da como resultado una composición o muestra "homogénea" o "pura", que se usa en la presente memoria para referirse a una composición o muestra que comprende menos de 100 ppm de HCP en una composición que comprende la proteína de interés, alternativamente menos de 90 ppm, menos de 80 ppm, menos de 70 ppm, menos de 60 ppm, menos de 50 ppm, menos de 40 ppm, menos de 30 ppm, menos de 20 ppm, menos de 10 ppm, menos de 5 ppm o menos de 3 ppm de HCP.

50 El término "etapa de clarificación", como se usa en la presente memoria, generalmente se refiere a una o más etapas

iniciales en la purificación de biomoléculas. La etapa de clarificación generalmente comprende la eliminación de células y/o restos celulares usando una o más etapas que incluyen cualquiera de las siguientes, solas o varias combinaciones de las mismas, por ejemplo, centrifugación y filtración en profundidad, precipitación, floculación y sedimentación. La etapa de clarificación generalmente implica la eliminación de una o más entidades indeseables, y se realiza típicamente antes de una etapa que implica la captura de la molécula objetivo deseada. Otro aspecto clave de la clarificación es la eliminación de componentes solubles e insolubles de una muestra que más tarde pueden provocar la contaminación de un filtro estéril en un proceso de purificación, lo que hace que el proceso de purificación general sea más económico. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una mejora respecto de las etapas de clarificación convencionales comúnmente utilizadas en diversos esquemas de purificación, como se demuestra por la reducción de la turbidez/impurezas y el mayor rendimiento de los filtros posteriores, descritos en los Ejemplos de la presente memoria.

El término "cromatografía", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier tipo de técnica que separa un analito de interés (por ejemplo, una molécula objetivo) de otras moléculas presentes en una mezcla. Por lo general, el analito de interés se separa de otras moléculas como resultado de las diferencias en las velocidades a las que las moléculas individuales de la mezcla migran a través de un medio estacionario bajo la influencia de una fase móvil, o en procesos de unión y elución.

Los términos "resina de cromatografía" o "medios de cromatografía" se usan indistintamente en la presente memoria, y se refieren a cualquier tipo de fase (por ejemplo, una fase sólida) que separa un analito de interés (por ejemplo, una molécula objetivo) de otras moléculas presentes en una mezcla. Por lo general, el analito de interés se separa de otras moléculas como resultado de las diferencias en las velocidades a las que las moléculas individuales de la mezcla migran a través de una fase sólida estacionaria bajo la influencia de una fase móvil, o en procesos de unión y elución. Los ejemplos de diversos tipos de medios de cromatografía incluyen, por ejemplo, resinas de intercambio catiónico, resinas de afinidad, resinas de intercambio aniónico, membranas de intercambio aniónico, resinas de interacción hidrófoba y monolitos de intercambio iónico.

El término "etapa de captura", como se usa en la presente memoria, generalmente se refiere a un método usado para unir una molécula objetivo con un polímero sensible a estímulos o una resina de cromatografía, que da como resultado una fase sólida que contiene un precipitado de la molécula objetivo y el polímero o resina. Típicamente, la molécula objetivo se recupera posteriormente usando una etapa de elución, que retira la molécula objetivo de la fase sólida, lo que da como resultado la separación de la molécula objetivo de una o más impurezas. En diversas realizaciones, la etapa de captura se puede realizar usando un medio de cromatografía, tal como una resina, membrana o monolito, o un polímero, tal como un polímero, polielectrolito o polímero sensible a estímulos que se une a la molécula objetivo.

El término "sal", como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto formado por la interacción de un ácido y una base. Las diversas sales que pueden usarse en los diversos tampones empleados en los métodos descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, acetato (por ejemplo, acetato de sodio), citrato (por ejemplo, citrato de sodio), cloruro (por ejemplo, cloruro de sodio), sulfato (por ejemplo, sulfato de sodio) o una sal de potasio.

El término "sal multivalente" o "ion multivalente", como se usa indistintamente en la presente memoria, se refiere a un compuesto que contiene más de una carga o un grupo que contiene carga. En algunas realizaciones, se usa una sal multivalente como un estímulo que da como resultado un cambio en la solubilidad de un polímero sensible al estímulo de la sal, lo que generalmente provoca la precipitación del polímero de la disolución. Las sales multivalentes ejemplares que pueden usarse incluyen, por ejemplo, fosfato y sulfato. La presente invención también abarca los contraiones que pueden usarse como, por ejemplo, citrato. Una sal multivalente, cuando se usa como estímulo como se describe en la presente memoria, se puede añadir como un reactivo independiente a una muestra que contiene una biomolécula de interés junto con un polímero sensible a estímulos. Alternativamente, la sal puede estar unida a un sustrato, por ejemplo, una membrana. En una realización particular, una membrana se modifica con poli(fosfato de vinilo), que es un recubrimiento polimérico que contiene una sal multivalente. Un ion multivalente utilizado como estímulo, como se describe en la presente memoria, se considera menos perjudicial para la estructura y estabilidad de la proteína, respecto de otros estímulos, como la temperatura y el pH.

En algunas realizaciones, las sales multivalentes son capaces de interactuar con una o más entidades, formando así una especie o complejo asociado. En consecuencia, dichas sales también pueden denominarse "sales formadoras de complejos". Los ejemplos no limitantes de sales formadoras de complejos y sus complejos resultantes son cationes multivalentes tales como  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y sus complejos con los grupos de ácido carboxílico hallados en el etilendiamintetraacetato; aniones multivalentes tales como fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) y citrato y sus complejos con aminas primarias que se hallan en la polialilamina; y sales que se asocian a iones tales como perclorato, dodecilsulfato y dodecilsulfonato y sus complejos con aminas primarias que se hallan en la polialilamina.

Una "sal que se asocia a iones" es una sal univalente (catión o anión), voluminosa y de carga dispersa. En algunas realizaciones, se usa una sal que se asocia a iones como un estímulo que da como resultado un cambio en la solubilidad de un polímero sensible al estímulo de la sal, lo que da como resultado la precipitación del polímero de la disolución. Los ejemplos de sales que se asocian a iones que pueden usarse incluyen, por ejemplo, perclorato, dodecil sulfato, dodecil bencenosulfonato, tetrafenil borato y hexanitrodifenol amina.

El término "disolvente", como se usa en la presente memoria, generalmente se refiere a una sustancia líquida capaz de disolver o dispersar una o más sustancias para proporcionar una disolución. Los disolventes incluyen disolventes acuosos y orgánicos, donde los disolventes orgánicos útiles incluyen un disolvente apolar, etanol, metanol, isopropanol, acetonitrilo, hexilenglicol, propilenglicol y 2,2-tiodiglicol.

- 5 El término "pI" o "punto isoeléctrico" de un polipéptido, como se usa indistintamente en la presente memoria, se refiere al pH al cual la carga positiva del polipéptido equilibra su carga negativa. El pI puede calcularse a partir de la carga neta de los residuos de aminoácidos o residuos de ácido siálico de los carbohidratos unidos del polipéptido, o puede determinarse mediante isoelectroenfoque.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes.

## 10 Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de un líquido de cultivo celular (CCF) sin expresión y sin clarificar

- 15 En un experimento representativo, se cultivaron células derivadas de una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) sin expresión en un biorreactor de 10 L (New Brunswick Scientific) a una densidad de  $10 \times 10^6$  células/ml, y se recogieron a un 64% de viabilidad. La IgG se añadió a una concentración de 1,3 g/L. Se descubrió que el nivel de proteínas de la célula huésped (HCP) fue de 8300 ng/mL utilizando un ELISA (Cygnus n° CM015). El pH del cultivo celular sin clarificar fue 7,2.

Ejemplo 2: Síntesis de un polímero sensible a estímulos que comprende un esqueleto de polielectrolito modificado con un grupo hidrófobo

- 20 En un experimento representativo, se sintetizó un polímero sensible a estímulos que comprendió un esqueleto de polialilamina (BzMPAA) modificada con un grupo hidrófobo. Se sintetizó un polímero que comprendió un esqueleto de polielectrolito catiónico modificado con un grupo hidrófobo usando una mezcla de 10,3 g de polialilamina lineal al 40% en peso (NITTOBO, 150 kD), 2 g de hidróxido de litio y 20 ml de un 50% de agua/metanol, que se agitó hasta que se mezcló bien. Se añadió una disolución de 2,1 ml de cloruro de bencilo en 15 ml de metanol a la disolución de polímero. La mezcla resultante se calentó a 60 °C durante 14 horas. La polialilamina modificada con bencilo se precipitó al final del período de reacción como resultado de la incompatibilidad termodinámica con el disolvente. El precipitado se lavó con 30 ml de acetona y se redisolvió en 400 ml de ácido acético 1 M. El polímero se purificó adicionalmente mediante precipitación usando fosfato de sodio 50 mM a pH 7. La Figura 1 muestra un esquema de la reacción del polímero de polielectrolito de polialilamina con un grupo hidrófobo, es decir, cloruro de bencilo.

Ejemplo 3: Preparación de una disolución de polialilamina modificada con bencilo (BzMPAA)

- 30 Se preparó una disolución al 10% de BzMPAA disolviendo 10 g del polímero del Ejemplo 2 en 90 g de ácido acético 1 M con agitación continua a temperatura ambiente durante 16 horas. La disolución viscosa resultante fue ligeramente turbia.

Ejemplo 4: Uso de diferentes concentraciones de polialilamina modificada con bencilo (BzMPAA) en la clarificación de un líquido de cultivo celular (CCF) sin expresión

- 35 Se añadió la BzMPAA del Ejemplo 3 en cantidades de 0,2 g, 0,3 g, 0,4 g y 0,5 g a una muestra de 5 ml del líquido de cultivo celular sin clarificar (CCF) del Ejemplo 1. Las muestras se mezclaron a temperatura ambiente durante 2 minutos. Como la adición de polímero redujo el pH a un intervalo de pH de 4,5 a 5,5, el pH de las mezclas se ajustó usando Tris-base 2 M a un pH de 7. A la disolución resultante se le añadieron 0,043 g de fosfato de potasio dibásico para precipitar el complejo polímero-molécula objetivo, células y restos celulares. El precipitado, en forma de suspensión sólida dispersa, se mezcló continuamente durante cinco minutos. El precipitado se recogió después mediante centrifugación (4000 rpm durante 1 minuto). El sobrenadante de cada muestra se filtró después a través de un filtro Durapore® de 0,2 µm. La purificación resultante se detalla en la Tabla 1 a continuación.

Ejemplo 5: Uso de diferentes valores de pH en la clarificación de CCF sin expresión con BzMPAA

- 45 Se añadió la BzMPAA del Ejemplo 3 a cuatro muestras (0,4 g cada una) que contenían 5 ml del líquido de cultivo celular sin clarificar del Ejemplo 1. Las muestras se mezclaron a temperatura ambiente durante 2 minutos. Como la adición de polímero redujo el pH a un intervalo de pH de 4,5 a 5,5, el pH de las mezclas se ajustó usando Tris-base 2 M a un pH de 5,5, 6,5, 7,5 y 8,5, respectivamente. A la disolución resultante se le añadieron 0,043 g de fosfato de potasio dibásico para precipitar el complejo polímero-molécula objetivo, células y restos celulares. El precipitado, que estaba en forma de una suspensión sólida dispersa, se mezcló continuamente durante cinco minutos. El precipitado se recogió después mediante centrifugación (4000 rpm durante 1 minuto). El sobrenadante de cada muestra se filtró después a través de un filtro Durapore® de 0,2 µm. La purificación resultante se detalla en la Tabla 1 a continuación, que describe la purificación de BzMPAA de CCF de CHO sin expresión.

Tabla 1.

Concentración de polímero (% en peso)	pH	Recuperación de IgG (%)	Eliminación de HCP (%)	Eliminación de ADN (LRV)
0,4	7	97	63	2,7
0,6	7	92	82	2,8
0,8	7	86	83	2,7
1,0	7	82	85	2,7
0,8	5,5	95	83	3,0
0,8	6,5	86	91	2,9
0,8	7,5	90	86	2,8
0,8	8,5	95	62	2,9

Ejemplo 6: Ensayo de los niveles de pureza resultantes del uso de BzMPAA en la clarificación de CCF

- 5 Las muestras del Ejemplo 4 y del Ejemplo 5 se analizaron con respecto a la recuperación de IgG usando un ensayo de HPLC analítica de afinidad con proteína A. El nivel de IgG en disolución se midió alternativamente utilizando una columna analítica de proteína A, específicamente, una columna Poros A/20 Protein A (Applied Biosystems) se equilibró con PBS, se eluyó con lisina 0,1 M (pH 2) y se lavó con guanidina HCl 6 M. Se creó una curva patrón de IgG usando una serie de volúmenes de inyección variables de IgG policlonal (Seracare). Se inyectaron las muestras y se determinaron las concentraciones de IgG a partir de la curva patrón.
- 10 Las muestras del Ejemplo 4 y del Ejemplo 5 se analizaron con respecto a las proteínas de la célula huésped (HCP) usando un kit comercial de ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) (Cygnus Technologies Inc., Southport, NC, Cygnus nº CM0 15). Las muestras del Ejemplo 4 y del Ejemplo 5 también se analizaron con respecto al ADN usando un ensayo PicoGreen habitual y ADN de esperma de arenque como patrón.

Ejemplo 7: Preparación de líquido de cultivo celular (CCF) sin clarificar

- 15 Las células derivadas de una línea celular de ovario de hámster chino con expresión (CHO-DG44) se cultivaron en un biorreactor de 10 L (New Brunswick Scientific) a una densidad de  $10 \times 10^6$  células/ml y se recogieron a un 30% de viabilidad. Se determinó que el título de anticuerpo monoclonal (MAb) fue de 0,8 g/L. Se descubrió que el nivel de proteínas de la célula huésped (HCP) fue de 200.000 ng/mL usando un ensayo ELISA (Cygnus nº 3G ELISA). El pH del cultivo celular sin clarificar fue 6,9.

20 Ejemplo 8 : Síntesis de polialilamina modificada con bencilo al 20% (BzMPAA)

- 25 Se colocaron 10 g de polialilamina (PAA) (Nittobo, 150 kD; 40% p/p) en un matraz de fondo redondo de 100 ml, y se añadió una disolución de 3,34 g de hidróxido de sodio (1,2 eq. por monómero) en 25 ml de H<sub>2</sub>O en pequeñas cantidades a temperatura ambiente con agitación magnética. El cloruro de bencilo (1,38 g, 1,25 ml) se añadió después en una porción, se agitó durante unos minutos a temperatura ambiente y después se calentó a 60 °C durante la noche durante 17 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se eliminó, dando como resultado la precipitación del polímero. El polímero precipitado se lavó con agua y posteriormente se agitó en una disolución acuosa de AcOH 1 M (40 ml) hasta que se logró la solubilización completa. Después, la disolución se diluyó con H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 400 ml (disolución de polímero al 1%), se añadió fosfato potásico dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (3,48 g) con agitación y el pH de la disolución se ajustó a aproximadamente 6,8 para precipitar el polímero modificado. El polímero se recogió mediante filtración sobre un embudo sinterizado, y finalmente se secó durante la noche en un horno de vacío durante a 50-60 °C.

Ejemplo 9: Síntesis de polialilamina modificada con bencilo al 40% (BzMPAA)

- 35 Se colocaron 10 g de polialilamina (PAA) (Nittobo, 150 kD; 40% peso/peso) en un matraz de fondo redondo de 100 ml, y se añadió una disolución de 3,34 g de hidróxido de sodio (1,2 eq. por monómero) en 25 ml de H<sub>2</sub>O a temperatura ambiente con agitación magnética y en pequeñas cantidades. Después se añadió cloruro de bencilo (2,30 g, 2,09 ml), se agitó durante unos minutos a temperatura ambiente y después se calentó a 60 °C durante la noche durante 17 horas. La reacción se enfrió después a temperatura ambiente y se eliminó el disolvente, dando como resultado la precipitación del polímero. El polímero precipitado se lavó con agua y se agitó en una disolución acuosa de AcOH 1 M (40 ml) hasta que se logró la solubilización completa. Después, la disolución se diluyó con H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 400 ml (disolución de polímero al 1%), se añadió fosfato potásico dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (3,48 g) con agitación y el pH de la disolución se ajustó a pH 6,8 para precipitar el polímero modificado. El polímero se recogió mediante filtración sobre un embudo sinterizado, y finalmente se secó durante la noche en un horno de vacío durante a 50-60 °C.

## Ejemplo 10: Síntesis de polialilamina modificada con bencilo al 60% (BzMPAA)

Se colocaron 10 g de polialilamina (PAA) (NITTOBO, 150 kD; 40% peso/peso) en un matraz de fondo redondo de 100 ml y se añadió una disolución de 3,34 g de hidróxido de sodio (1,2 eq. por monómero) en 25 ml de H<sub>2</sub>O a temperatura ambiente con agitación magnética y en pequeñas cantidades. Después se añadió cloruro de bencilo (3,23 g, 2,94 ml) y se agitó durante unos minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se calentó a 60 °C durante la noche durante 17 horas. La reacción se enfrió después a temperatura ambiente y se eliminó el disolvente. El polímero precipitado se lavó con agua y después se agitó en una disolución acuosa de AcOH 1 M (40 ml) hasta que se logró la solubilización completa. Después, la disolución se diluyó con H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 400 ml (disolución de polímero al 1%), se añadió fosfato potásico dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (3,48 g) con agitación y el pH de la disolución se ajustó a pH 6,8 para precipitar el polímero modificado. El polímero se recogió mediante filtración en un embudo sinterizado, y finalmente se secó durante la noche en un horno de vacío a 50-60 °C.

## Ejemplo 11: Síntesis de polialilamina modificada con difenilo (DPhMPAA)

En un experimento ejemplar, se modificó un esqueleto de polímero de polielectrolito, polialilamina, con un grupo difenilo. Brevemente, se colocaron 10 g de polialilamina (PAA) (Nittobo, 150 kD; 40% peso/peso) en un matraz de fondo redondo de 100 ml y se añadió una disolución de 3,34 g de hidróxido de sodio (1,2 eq. por monómero) en 25 ml de H<sub>2</sub>O a temperatura ambiente con agitación magnética en pequeñas cantidades. El cloro-difenil metano (3,68 g, 3,23 ml) se añadió posteriormente, se agitó durante unos minutos a temperatura ambiente y después se calentó a 60 °C durante la noche durante 17 horas. La reacción se dejó enfriar posteriormente a temperatura ambiente y se eliminó el disolvente. El polímero precipitado se lavó con agua y se agitó en una disolución acuosa 1 M de AcOH (40 ml). El sólido blanco restante, generado por la hidrólisis del difenilclorometano, se filtró. La disolución se diluyó posteriormente con H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 400 ml (disolución de polímero al 1%), se añadió fosfato potásico dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (3,48 g) con agitación y el pH de la disolución se ajustó a pH 6,8 para precipitar el polímero modificado. El polímero se recogió mediante filtración sobre un embudo sinterizado, y finalmente se secó durante la noche en un horno de vacío durante a 50-60 °C.

## Ejemplo 12: Síntesis de polialilamina modificada con diclorobencilo al 6% (DCIBzMPAA)

En otro experimento, se colocaron 10 g de polialilamina (PAA) (NITTOBO, 150 kD; 40% peso/peso) en un matraz de fondo redondo de 100 ml, y se añadió una disolución de 3,34 g de hidróxido de sodio (1,2 eq. por monómero) en 25 ml de H<sub>2</sub>O a temperatura ambiente con agitación magnética y en pequeñas cantidades. Posteriormente se añadió cloruro de 3,4-diclorobencilo (1,71 g, 1,21 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche durante 17 horas. La mezcla de reacción se diluyó posteriormente con 100 ml de H<sub>2</sub>O, tras lo cual el pH se ajustó a neutro (pH 7,0) con ácido fosfórico. El polímero precipitado se separó mediante filtración, se lavó con H<sub>2</sub>O y se secó en un horno de vacío durante la noche a 60 °C. El polímero se recogió mediante filtración sobre un embudo sinterizado, y finalmente se secó durante la noche en un horno de vacío durante a 50-60 °C.

## Ejemplo 13: Síntesis de polialilamina modificada con diclorobencilo al 10% (DCIBzMPAA)

En otro experimento representativo, se sintetizó una polialilamina modificada con diclorobencilo al 10% de la siguiente manera, se colocaron 5 g de polialilamina (PAA) (NITTOBO, 150 kD; 40% peso/peso) en un matraz de fondo redondo de 100 ml y se añadió una disolución de 1,68 g de hidróxido de sodio (1,2 eq. por monómero) en 40 ml de 50/50 de H<sub>2</sub>O/1,2-dimetoxietano (DME) a temperatura ambiente con agitación magnética y en pequeñas cantidades. Posteriormente se añadió cloruro de 3,4-diclorobencilo (0,57 g, 0,40 ml), se agitó durante unos minutos a temperatura ambiente y después se calentó a 60 °C durante la noche durante 21 horas. La reacción se dejó enfriar posteriormente a temperatura ambiente, se eliminó el DME a vacío a 60-70 °C y después se eliminó el disolvente restante. El polímero precipitado se lavó con agua y después se agitó en una disolución acuosa de AcOH 1 M (20 ml) hasta que se logró la solubilización completa. Después, la disolución se diluyó con H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 200 ml (disolución de polímero al 1%), se añadió fosfato potásico dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (1,74 g) con agitación y el pH de la disolución se ajustó a pH 6,8 para precipitar el polímero modificado. El polímero se recogió mediante filtración en un embudo sinterizado y finalmente se secó durante la noche en un horno de vacío a 50-60 °C.

## Ejemplo 14: Síntesis de polialilamina modificada con clorobencilo al 33% (DCIBzMPAA)

En otro experimento representativo, se sintetizó una polialilamina modificada con clorobencilo al 33% de la siguiente manera. Se colocaron 5 g de polialilamina (PAA) (NITTOBO, 150 kD; 40% peso/peso) en un matraz de fondo redondo de 100 ml y se añadió una disolución de 3,34 g de hidróxido de sodio (1,2 eq. por monómero) en 40 ml de 50/50 de H<sub>2</sub>O/1,2-dimetoxietano (DME) a temperatura ambiente con agitación magnética y en pequeñas cantidades. Posteriormente se añadió cloruro de 4-clorobencilo (1,48 g), se agitó durante unos minutos a temperatura ambiente y después se calentó a 60 °C durante la noche durante 21 horas. Al día siguiente, el DME se evaporó a vacío a 60-70 °C y el disolvente restante se separó del polímero precipitado. Este último se lavó con agua y después se agitó en una disolución acuosa de AcOH 1 M (20 ml) hasta que se logró la solubilización completa. La disolución se diluyó posteriormente con H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 200 ml (disolución de polímero al 1%), se añadió fosfato potásico dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (1,74 g) con agitación y el pH de la disolución se ajustó a pH 7 para precipitar el polímero purificado. El polímero se recogió mediante filtración en un embudo sinterizado y finalmente se secó durante la noche a vacío a

50-60 °C.

Ejemplo 15: Síntesis de polialilamina modificada con fenilbencilo al 13% (DCIBzMPAA)

5 En otro experimento, se sintetizó una polialilamina modificada con fenil-bencilo al 13% como sigue. Se colocaron 4,7 g de polialilamina (PAA) (Nittobo, 150 kD; 40% peso/peso) en un matraz de fondo redondo de 100 ml, y se añadió una disolución de 3,34 g de hidróxido de sodio (1,2 eq por monómero) en 40 ml de 50/50 de H<sub>2</sub>O/1,2-dimetoxietano (DME) a temperatura ambiente con agitación magnética y en pequeñas cantidades. Después se añadió cloruro de 4-fenilbencilo (1 g) y la mezcla se calentó durante la noche a 55 °C durante 20 horas. Posteriormente, la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, el DME se eliminó a vacío a 60-70 °C y el disolvente restante se eliminó del polímero precipitado. Este último se lavó con agua y después se agitó en una disolución acuosa de AcOH 1 M (40 ml) durante la noche para completar la solubilización. La disolución se diluyó posteriormente con H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 200 ml (disolución de polímero al 1%), se añadió fosfato potásico dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (1,74 g) con agitación y el pH de la disolución se ajustó a pH 7,0 para precipitar el polímero purificado. El polímero se recogió mediante filtración en un embudo sinterizado y finalmente se secó durante la noche a vacío a 50-60 °C.

Ejemplo 16: Síntesis de polialilamina modificada con fenilbencilo al 27% (DCIzMPAA)

15 En otro experimento, se sintetizó una polialilamina modificada con fenil-bencilo al 27% como sigue. Se colocaron 2,8 g de polialilamina (PAA) (Nittobo, 150 kD; 40% peso/peso) en un matraz de fondo redondo de 100 ml, y se añadió una disolución de 3,34 g de hidróxido de sodio (1,2 eq. por monómero) en 24 ml de 50/50 de H<sub>2</sub>O/1,2-dimetoxietano (DME) a temperatura ambiente con agitación magnética y en pequeñas cantidades. Posteriormente se añadió cloruro de 4-fenilbencilo (1 g) y la mezcla se calentó a 55 °C durante la noche durante 20 horas. Posteriormente, la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, el DME se eliminó a vacío a 60-70 °C y el disolvente restante se eliminó del polímero precipitado. Este último se lavó con agua, después se agitó en una disolución acuosa de AcOH 1 M (32 ml) y se agitó durante la noche para completar la solubilización. La disolución se diluyó posteriormente con H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 200 ml (disolución de polímero al 1%), se añadió fosfato potásico dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (1,74 g) con agitación y el pH de la disolución se ajustó a pH 7,0 para precipitar el polímero purificado. El polímero se recogió mediante filtración en un embudo sinterizado y finalmente se secó durante la noche a vacío a 50-60 °C.

Ejemplo 17: Clarificación de CCF con diferentes concentraciones de polímero

30 En un experimento ejemplar, los polímeros sensibles a estímulos, descritos anteriormente en los Ejemplos 8-16, se evaluaron con respecto a la clarificación de CCF, cuya preparación se describe anteriormente en el Ejemplo 7. Se añadió una disolución de polímero de los Ejemplos 8-16 en cantidades de 0,2 g, 0,3 g, 0,4 g y 0,5 g a una muestra de 5 ml del líquido de cultivo celular sin clarificar. Las muestras se mezclaron a temperatura ambiente durante 2 minutos. Como la adición de polímero redujo el pH a un intervalo de pH de 4,5 a 5,5, el pH de las mezclas se ajustó usando Tris-base 2 M a un pH de 7. A la disolución resultante se le añadieron 0,043 g de fosfato de potasio dibásico para precipitar el complejo polímero-molécula objetivo, células y restos celulares. El precipitado, en forma de suspensión sólida dispersa, se mezcló continuamente durante cinco minutos. El precipitado se recogió después mediante centrifugación (4000 rpm durante 1 minuto). El sobrenadante de cada muestra se filtró posteriormente a través de un filtro Durapore® de 0,2 µm. La purificación resultante se detalla en la Tabla 2.

Ejemplo 18: Clarificación de CCF con polímeros a diferentes pH

40 En otro experimento, se añadió una disolución de polímero de los Ejemplos 8-16 a cuatro muestras (0,4 g cada una) que contenían 5 ml del líquido de cultivo celular sin clarificar, como se describe en el Ejemplo 7. Las muestras se mezclaron a temperatura ambiente durante 2 minutos. Dado que la adición del polímero redujo el pH a un intervalo de pH 4,5 a 5,5, el pH de las mezclas se ajustó usando Tris-base 2 M a un pH de 5,5, 6,5, 7,5 y 8,5, respectivamente. A la disolución resultante se le añadieron 0,043 g de fosfato de potasio dibásico para precipitar el complejo polímero-molécula objetivo, células y restos celulares. El precipitado, en forma de suspensión sólida dispersa, se mezcló continuamente durante cinco minutos. El precipitado se recogió después mediante centrifugación (4000 rpm durante 1 minuto). El sobrenadante de cada muestra se filtró posteriormente a través de un filtro Durapore® de 0,2 µm. La purificación resultante se describe en la Tabla 2.

Ejemplo 19: Clarificación de CCF usando polímeros sensibles a diferentes niveles de estímulo de iones multivalentes

50 En otro experimento, los polímeros descritos en los Ejemplos 8-15 se evaluaron con respecto a la clarificación de CCF, usando diferentes cantidades de estímulo de iones multivalentes. Específicamente, se añadieron los polímeros de los Ejemplos 8-15 a cuatro muestras (0,4 g cada una) que contenían 5 ml del líquido de cultivo celular sin clarificar, descrito en el Ejemplo 7. Las muestras se mezclaron a temperatura ambiente durante 2 minutos. Como la adición de polímero redujo el pH a un intervalo de pH de 4,5 a 5,5, el pH de las mezclas se ajustó usando Tris-base 2 M a un pH de 5,5, 6,5 7,5 y 8,5, respectivamente. A la disolución resultante, se le añadió un intervalo de 0,031 a 0,043 g (concentración final de fosfato de 50 a 70 mM) de fosfato de potasio dibásico para precipitar los complejos polímero-molécula objetivo, células y restos celulares. El precipitado, en forma de suspensión sólida dispersa, se mezcló continuamente durante cinco minutos. El precipitado se recogió posteriormente mediante centrifugación (4000 rpm durante 1 minuto). El sobrenadante de cada muestra se filtró después a través de un filtro Durapore® de 0,2 µm. La purificación resultante se describe en la Tabla 2.

Ejemplo 20: Clarificación de CCF usando un floculante usado habitualmente

5 En otro experimento, se utilizó un floculante usado habitualmente, el quitosano, para la clarificación de CCF, en un intento de generar datos comparativos. Se preparó una disolución de polímero (2% en peso) de acuerdo con el procedimiento descrito en Riske, F. et al.; Journal of Biotechnology, 128 (2007) 813-823. La disolución de polímero se añadió al CCF del Ejemplo 7 en cantidades variables y en condiciones de pH variables. No se usó ningún estímulo con este polímero. La purificación resultante se describe en la Tabla 2.

Ejemplo 21: Evaluación de los niveles de pureza después de la precipitación de CCF usando polímeros sensibles a estímulos

10 En un experimento representativo, los polímeros descritos en los Ejemplos 8-16 se analizaron con respecto a la recuperación de IgG usando un ensayo de HPLC analítica de afinidad con proteína A. El nivel de IgG en disolución se midió alternativamente usando una columna analítica de proteína A. Una columna Poros A/20 Protein A (Applied Biosystems) se equilibró con PBS, se eluyó con lisina 0,1 M (pH 2) y se limpió con guanidina HCl 6 M. Se creó una curva patrón de IgG usando una serie de volúmenes de inyección variables de IgG policlonal (Seracare). Se inyectaron las muestras y se determinaron las concentraciones de IgG a partir de la curva patrón. En las muestras de los Ejemplos 15 8-16 se analizaron las proteínas de células huésped (HCP) utilizando un kit comercial de ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) (Cygnus Technologies Inc., Southport, NC, Cygnus nº 3G). En las muestras de los Ejemplos 8-16 se analizó el ADN usando un ensayo PicoGreen habitual y ADN de esperma de arenque como patrón. Para evaluar la reducción de las células y los restos celulares, se midió la turbidez después de la centrifugación durante 1 minuto a 4000 rpm.

20 Tabla 2. Datos de caracterización para los Ejemplos 8-16 y 20.

Ejemplo	Conc. de Polímero (% en peso)	Conc. de Sal Multivalente (mM)	pH	Turbidez (NTU)	Recuperación de IgG (%)	Eliminación de HCP (%)	Eliminación de ADN (%)
8	0,4	70	7,5	26,7	88	58	95
8	0,6	70	7,5	12,8	86	65	95
8	0,8	62	7,5	31,4	79	72	97
8	1,0	62	7,5	104	79	75	94
8	0,8	62	8,5	7,8	71	67	95
8	0,8	62	6,5	60,8	86	76	96
8	0,8	62	5,5	76,5	99	76	97
9	0,4	70	7,5	2,2	82	83	98
9	0,6	70	7,5	2,5	64	85	> 99
9	0,8	62	7,5	2,8	61	87	> 99
9	1,0	62	7,5	2,8	53	88	> 99
9	0,8	62	8,5	7,1	79	80	> 99
9	0,8	62	6,5	3,0	58	9,1	98
9	0,8	62	5,5	3,4	87	92	97
10	0,4	70	7,5	5,1	54	88	95
10	0,6	70	7,5	4,9	26	90	98
10	0,8	62	7,5	5,6	21	93	> 99
10	1,0	62	7,5	1,9	18	93	> 99
10	0,8	62	8,5	6,1	40	89	> 99
10	0,8	62	6,5	5,0	14	96	> 99
10	0,8	62	5,5	2,8	26	95	> 99
11	0,4	70	7,5	124	97	42	98
11	0,6	79	7,5	210	61	52	98
11	0,8	62	7,5	478	92	56	99
11	1,0	62	7,5	474	84	55	98
11	0,8	62	8,5	94,2	54	65	98
11	0,8	62	6,5	380	88	60	97

ES 2 754 210 T3

11	0,8	62	5,5	212	99	58	97
12	0,6	70	7,5	3,4	50	74	> 99
12	0,8	62	7,5	1,9	85	58	> 99
12	1,0	62	7,5	1,3	70	66	> 99
12	0,8	62	8,5	14	33	8,1	> 99
12	0,8	62	6,5	1,0	37	93	> 99
12	0,8	62	5,5	14	93	77	> 99
12	0,6	50	7,5	1,7	81	85	> 99
12	0,6	50	6,5	3,1	87	80	> 99
12	0,4	50	5,5	1,6	98	66	> 99
13	0,4	70	7,5	2,3	86	71	98
13	0,6	70	7,5	1,9	71	73	98
13	0,8	62	7,5	2,4	81	77	> 99
13	1,0	62	7,5	1,4	68	80	> 99
13	0,8	62	8,5	1,5	60	69	> 99
13	0,8	62	6,5	1,1	77	87	> 99
13	0,8	62	5,5	1,3	98	90	> 99
13	0,6	50	7,5	1,7	78	84	> 99
13	0,6	50	6,5	3,1	39	84	> 99
13	0,4	50	5,5	1,6	69	78	> 99
14	0,4	70	7,5	5,4	69	91	> 99
14	0,6	70	7,5	7,3	46	89	> 99
14	0,8	62	7,5	5,1	57	94	> 99
14	1,0	62	7,5	4,3	22	87	> 99
14	0,8	62	8,5	2,8	4,1	92	> 99
14	0,8	62	6,5	3,7	2	97	> 99
14	0,8	62	5,5	8,5	7	94	> 99
14	0,6	50	7,5	7,5	44	89	> 99
14	0,6	50	6,5	6,5	57	96	> 99
14	0,4	50	5,5	6,6	43	90	> 99
15	0,4	70	7,5	3,0	93	75	> 99
15	0,6	70	7,5	1,5	~ 100	86	> 99
15	0,8	62	7,5	2,7	91	72	> 99
15	1,0	62	7,5	2,4	67	91	> 99
15	0,8	62	8,5	2,3	~ 100	77	> 99
15	0,8	62	6,5	1,4	57	87	> 99
15	0,8	62	5,5	2,0	89	90	> 99
15	0,6	50	7,5	5,3	~ 100	88	> 99
15	0,6	50	6,5	6,3	~ 100	70	> 99
15	0,4	50	5,5	7,9	~ 100	83	> 99
16	0,4	70	7,5	9,4	85	77	> 99
16	0,6	70	7,5	9,9	54	93	> 99
16	0,8	62	7,5	9,7	~ 100	85	> 99
16	1,0	62	7,5	19,0	67	94	> 99
16	0,8	62	8,5	9,1	~ 100	84	> 99
16	0,8	62	6,5	5,6	78	94	> 99

## ES 2 754 210 T3

16	0,8	62	5,5	4,2	54	88	> 99
16	0,6	50	7,5	7,2	56	90	> 99
16	0,6	50	6,5	4,1	89	92	> 99
16	0,4	50	5,5	2,6	85	89	> 99
20	1	0	7,5	27,0	~ 100	39	30
20	0,8	0	8,5	22,0	61	63	54
20	08	0	6,5	16,0	70	30	34
20	0,8	0	5,5	195,0	63	62	96

### Ejemplo 22: Síntesis de polietilenimina modificada con bencilo (BzMPEI)

En otro experimento, se sintetizó un polímero sensible a estímulos de polietilenimina modificada con bencilo de la siguiente manera, se colocaron 10 g de PEI (Aldrich, 750 kD; 50% peso/peso) en un matraz de fondo redondo de 100 ml, y se añadió una disolución de ~ 3,34 g de hidróxido de sodio (1,2 eq. por monómero) en 25 ml de H<sub>2</sub>O a temperatura ambiente con agitación magnética y en pequeñas cantidades. Después se añade cloruro de bencilo (2,30 g, 2,09 ml), se agita durante unos minutos a temperatura ambiente y después se calienta durante la noche a 60 °C durante 17 horas. Después se deja enfriar la reacción a temperatura ambiente y se elimina el disolvente. El polímero precipitado se lava con agua y después se agita en una disolución acuosa de AcOH 1 M (40 ml) hasta que se logra la solubilización completa. La disolución se diluye posteriormente con H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 400 ml (disolución de polímero al 1%), se añade fosfato potásico dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (3,48 g) con agitación y el pH de la disolución se ajusta a pH 6,8 para precipitar el polímero modificado. El polímero se recoge mediante filtración en un embudo sinterizado y finalmente se seca durante la noche en un horno de vacío a 50-60 °C.

### Ejemplo 23: Síntesis de polivinilamina modificada con bencilo (BzMPVA)

En un ejemplo representativo, se sintetizó una polivinilamina modificada con bencilo como sigue. Se pesaron 32 g de hidrocloreuro de poli(vinilamina) (PVA) (PM 83.500, Air Products and Chemicals Inc.) en un recipiente de vidrio. Se añaden 200 ml de H<sub>2</sub>O y se añaden 26 g de NaOH al 50%, y se agita hasta que se mezcle bien. Se añaden 23,5 g de cloruro de bencilo y se mezcla a 70 °C durante 16 horas. Se separa una masa blanca sólida del sobrenadante a medida que avanza la reacción. Se permite que el sólido se asiente y se desecha el sobrenadante decantándolo. Se disuelve el sólido en 350 ml de ácido acético al 3% durante la noche. Se añaden 360 ml de H<sub>2</sub>O y se mezcla durante 16 horas hasta que la disolución es homogénea. Se diluye hasta una disolución al 1% p/v al llevar el volumen total hasta 3,2 L con H<sub>2</sub>O desionizada (DI). Se añade fosfato de sodio a una concentración de 50 mM para iniciar la precipitación del polímero. Se añade NaOH 1 M para alcanzar un pH de 6,8, lo que proporciona una precipitación adicional del polímero. Se filtra hasta una torta seca y se desecha el sobrenadante. Se seca el sólido durante la noche a 70 °C. Se disuelve en ácido acético al 3% hasta que se genera una disolución homogénea para obtener una disolución al 5% p/v.

### Ejemplo 24: Comparación del polímero modificado y sin modificar en la clarificación en presencia de estímulo

La polialilamina (PAA, Nittobo, 150 kD; 40% peso/peso) y el polímero del Ejemplo 10 (Bz-MPAA) se añadieron a una disolución acuosa para crear una concentración final de polímero del 0,2% en peso y 0,4%, respectivamente. Se usó fosfato de potasio dibásico como estímulo, y se añadió a las disoluciones de polímero de PAA y del Ejemplo 10 en cantidades variables, y se registró la turbidez y la naturaleza de los agregados formados. Los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3.

Polímero	Estímulo (fosfato de potasio dibásico, mM)	Turbidez (NTU)	Naturaleza del Agregado
PAA	2,4	2,1	Claro (sin agr.)
PAA	4,7	3	Claro (sin agr.)
PAA	9,35	17,9	Claro (sin agr.)
PAA	18,7	41,2	Turbio
PAA	37,5	152	Turbio
PAA	75	764	Lechoso/opaco
PAA	150	760	Lechoso/opaco
Ejemplo 10 (BzMPAA)	2,4	1	Claro (sin agr.)

Ejemplo 10 (BzMPAA)	4,7	2	Claro (sin agr.)
Ejemplo 10 (BzMPAA)	9,35	4	Claro (sin agr.)
Ejemplo 10 (BzMPAA)	18,7	9	Claro (sin agr.)
Ejemplo 10 (BzMPAA)	37,5	28	Claro (sin agr.)
Ejemplo 10 (BzMPAA)	75	230	Agregados grandes
Ejemplo 10 (BzMPAA)	150	231	Agregados grandes

Ejemplo 25: Comparación del polímero modificado y sin modificar en la clarificación en presencia de un estímulo

Los polímeros de polialilamina sin modificar (PAA, Nittobo, 150 kD; 40% peso/peso), polietilenimina (PEI, Aldrich, 750 kD; 50% peso/peso), polivinilamina (clorhidrato de poli(vinilamina) (PVA), PM 83.500, Air Products and Chemicals Inc.) y los polímeros modificados de los Ejemplos 10 (Bz-MPAA), Ejemplo 22 (BzMPEI) y Ejemplo 23 (BzMPVA) se añadieron a una disolución acuosa para crear una concentración final de polímero del 0,2% y 0,4% en peso, respectivamente. Se usó fosfato de potasio dibásico (150 mM) como estímulo y se añadió a cada una de las disoluciones de polímero al 0,4%, y se registró la turbidez y la naturaleza de los agregados formados. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Polímero	Estímulo (fosfato de potasio dibásico)	Turbidez antes del estímulo (NTU)	Turbidez después del estímulo (NTU)	Naturaleza del agregado después del estímulo	Turbidez después de centrifugar (NTU)
PAA	150 mM	0,1	> 1000	Lechoso	348
PEI	150 mM	2,9	> 1000	Lechoso	> 1000
PVA	150 mM	0,5	> 1000	Lechoso	233
Ejemplo 9 (BzMPAA)	150 mM	1,9	> 1000	Agregados grandes	9,6
Ejemplo 18 (BzMPEI)	150 mM	5,1	> 1000	Lechoso con Agregados Grandes	385
Ejemplo 19 (BzMPVA)	150 mM	3,2	> 1000	Agregados grandes	12,7

Ejemplo 26: Síntesis de ácido hexanoico y polialilamina modificada con terc-butilo (HC-t-BuMPAA)

Se disolvieron 3,49 g de ácido 6-bromohexanoico en una disolución que comprendía 10 ml de polímero lineal de poli(alilamina) al 40% en peso (150 kDa, NITTOBO) y 30 ml de hidróxido de sodio (1 M). La mezcla se hizo reaccionar durante 18 horas a T = 50 °C y el producto se precipitó como un gel hidratado. El precipitado se disolvió en una disolución de hidróxido de litio de 100 mg/ml y se mezcló con 10 ml de metanol que contenía 2,5 ml de terc-butil glicidil éter. La mezcla se hizo reaccionar posteriormente durante 18 horas a T = 50 °C. La disolución de polímero se purificó mediante diálisis prolongada (3 días) con agua desionizada (DI) usando un tubo de diálisis de umbral de peso molecular de 3,5 kDa. La concentración final de la disolución de polímero fue del 7,2% en peso. Se muestra un esquema de la reacción de síntesis a continuación en la Figura 2.

Ejemplo 27: Efecto del cloruro de sodio sobre el estímulo multivalente de ácido hexanoico y la polialilamina modificada con terc-butilo (HC-t-BuMPAA) cuando se disuelve en tampón Tris

Se añadieron 600 µl de HC-t-BuMPAA del Ejemplo 26 a 10 ml de fosfato de sodio 25 mM que contenía cloruro de sodio 0, 0,15 o 0,5 M. El pH final de la disolución fue de 11,6. La disolución se tituló con ácido acético 3 M, y la turbidez de la disolución se registró después de cada adición. Como se representa en la Figura 3, al añadir cloruro de sodio además de fosfato de sodio, se observó un cambio en la capacidad de respuesta al pH, en el cual se da la transición de fase.

Ejemplo 28: Clarificación de CCF usando el polímero HC-t-BuMPAA a diferentes concentraciones de polímero

En un experimento representativo, el CCF sin aclarar se aclaró usando un polímero útil en la presente invención como sigue, se añadieron 178, 356 o 534 µl de HC-t-BuMPAA del Ejemplo 26 a 5 ml de líquido de cultivo celular sin clarificar del Ejemplo 1 que contenía fosfato de sodio 25 mM, y se ajustó a pH 8,7 usando 25 µl de ácido acético 3 M. Después de la adición del polímero, el pH final de la disolución se tituló a 7,2 usando ácido acético 3 M, precipitando así el complejo polímero-células.

El precipitado, en forma de suspensión sólida dispersa, se mezcló continuamente durante otros 5 min. El precipitado se recogió después mediante centrifugación (4000 rpm durante 1 minuto) y el sobrenadante se filtró a través de un filtro Durapore® de 0,2 µm. Independientemente de la concentración del polímero utilizado, el proceso dio como resultado una recuperación del 100% de Mab.

5 Ejemplo 29: Síntesis de polímero sensible a estímulos de polivinilamina (PVA) a partir del monómero

Se sintetizó un polímero sensible a estímulos compuesto por unidades repetidas que contenían aminas primarias a partir de un monómero como sigue. Se colocaron 165 g de agua desionizada y 22,5 g de N-vinilformamida (NVF) (SIGMA-ALDRICH, 98%) en un matraz de fondo redondo de 250 ml. El matraz estaba equipado con un agitador magnético y una varilla de N<sub>2</sub>. La disolución se agitó y se purgó con N<sub>2</sub> durante 0,5 horas, seguido de calentamiento a 45 °C a lo largo de 0,5 horas adicionales con purga continua. La disolución de iniciador se preparó añadiendo 0,288 g de diclorhidrato de 22'-Azobis(2-amidinopropano) (ABAP) (Aldrich) a 10 ml de agua desionizada y disolviéndolo. Al matraz de fondo redondo de 250 ml se le añadió la disolución de iniciador bajo una atmósfera de N<sub>2</sub>. La disolución se calentó a 55 °C durante 1 hora, seguido de calentamiento a 65 °C durante 2 horas, seguido después de calentamiento a 75 °C durante 1 hora con agitación vigorosa bajo nitrógeno. Se obtuvo una disolución viscosa y homogénea, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La viscosidad se determinó mediante el viscosímetro Brookfield Viscosity DV-II+ Pro (ajuste a 100 RPM, par de torsión del 345%, husillo n° 34). La viscosidad de la disolución resultante fue de 278 a 350 centipoises (cP). La disolución se transfirió a un matraz de 500 ml y se diluyó con 330 ml de H<sub>2</sub>O, y se añadieron 40 g de NaOH al 50% con agitación. La disolución se calentó a 85 °C durante 8 horas.

Se analizó la sensibilidad de una pequeña muestra a un estímulo de fosfato añadiendo una gota de fosfato de sodio 2 M al polímero hidrolizado y observando un precipitado sólido blanco de la disolución tras la adición del ion fosfato. A la disolución de polímero hidrolizado se le añadió HCl al 25% gota a gota, hasta alcanzar un pH de alrededor de 2. La disolución se agitó vigorosamente durante la noche, y se obtuvo una disolución amarilla homogénea. A esa disolución se le añadieron 100 ml de NaOH 4 M con agitación junto con 500 ml de alcohol isopropílico. El polímero se aisló mediante la adición de 100 ml de fosfato sódico 2 M, y el sólido se filtró a vacío y se lavó con agua desionizada. El polímero sólido se secó durante la noche en un horno de vacío a 65 °C. El polímero parcialmente seco se congeló con nitrógeno líquido y se molió hasta un polvo fino, y se secó adicionalmente en un horno de vacío a 65 °C durante 24 horas. Finalmente, se recuperaron 40,7 g de un polvo seco y se disolvieron en ácido acético 1 M hasta una concentración final de 5% p/p.

Una visión general del proceso de síntesis de polivinilamina se muestra en la Figura 4.

30 Ejemplo 30: Síntesis de una serie de polímeros sensibles a estímulos de polivinilamina modificada de manera hidrófoba (PVA)

Usando el PVA sintetizado a partir del Ejemplo 29, se produjeron tres polímeros sensibles a estímulos modificados de manera hidrófoba por separado de la siguiente manera. Se colocaron 100 ml de la disolución de PVA al 5% del Ejemplo 29 en cada uno de tres recipientes de vidrio de 500 ml, y los recipientes se etiquetaron 1, 2 y 3. A cada uno de los tres recipientes, se les añadieron con agitación 100 g de NaOH 4 M. A continuación, se añadieron 50 g de 1-propanol a cada recipiente como codisolvente, y las disoluciones se agitaron, seguido de la adición de 0,74 g, 1,47 g y 2,94 g de cloruro de bencilo a los recipientes 1, 2 y 3, respectivamente. Los tres recipientes se calentaron a 60 °C durante 16 horas. Cada uno de los polímeros resultantes se aisló de las disoluciones de reacción individuales llevando el volumen de la disolución de reacción a 500 ml con agua desionizada, ajustando el pH a 8 con HCl al 25% y añadiendo 100 g de fosfato de sodio 2 M. Tras la adición del ion fosfato, se recogió un precipitado sólido mediante filtración a vacío. El sólido de cada reacción se lavó individualmente con agua desionizada y se disolvió en 300 ml de ácido acético 1 M. El polímero se purificó adicionalmente ajustando las disoluciones individuales a pH 7,4, precipitando el polímero con la adición gota a gota de fosfato de sodio 2 M, filtrando los sólidos resultantes, lavando los sólidos con agua, seguido de alcohol isopropílico y secándolo en un horno de vacío a 65 °C durante 2 días. Cada muestra de polímero seco se congeló con nitrógeno líquido y se molió hasta un polvo fino. La masa de polímero seco recuperado fue 1,44, 2,12 y 2,47 g para los recipientes 1, 2 y 3, respectivamente. Los polímeros individuales se disolvieron cada uno para hacer una disolución al 2% en ácido acético 1 M.

Ejemplo 31: Desprotección de aminas mediante hidrólisis de una poli(N-vinilacetamida) de peso molecular muy alto para producir un polímero sensible a estímulos de polivinilamina (PVA)

50 En otro experimento ejemplar, se preparó un polímero sensible a estímulos de peso molecular muy alto como sigue. El polímero de peso molecular muy alto generalmente se refiere a un polímero que tiene un peso molecular igual o mayor que 1000 KDa.

Se preparó un polímero sensible a estímulos compuesto por unidades repetidas que contenían aminas primarias como sigue. En un recipiente de vidrio de 2 litros, se disolvieron 40 g de homopolímero lineal de poli (N-vinilacetamida) (POLYSCIENCES, INC.) con un peso molecular promedio de 4.060 kDa en 0,8 litros de agua desionizada mediante agitación vigorosa durante 16 horas. A esta disolución se le añadieron 140 g de HCl concentrado con agitación continua durante 1 hora. El recipiente se tapó ligeramente y la disolución se calentó a 99 °C durante 5 días con rotación intermitente para mezclar la disolución. Después de 5 días de calentamiento, la disolución se dejó enfriar a temperatura

- ambiente y el volumen total se ajustó a 4 litros con agua desionizada. La disolución se ajustó a pH 7 con NaOH 8 M con agitación vigorosa. El producto hidrolizado se precipitó con la adición gota a gota de fosfato de sodio 2 M hasta que no se observó más precipitado. El precipitado blanco se lavó con agua desionizada y se presionó para eliminar el exceso de agua. El polímero recuperado se secó en un horno de vacío a 65 °C durante 2 días. El polímero seco se congeló con nitrógeno líquido y se molió hasta un polvo fino. La masa seca recuperada fue de 42,5 g. Se preparó una disolución al 2% disolviendo el polvo seco en ácido acético 1 M y HCl al 0,08%. La disolución resultante se comparó con una disolución al 2% de material de partida (homopolímero lineal de poli(N-vinilacetamida)) con respecto a la respuesta a un estímulo de fosfato o citrato. Esto se realizó mediante la adición gota a gota de fosfato de sodio 2 M o citrato de sodio 0,2 M a muestras de 50 ml tanto del material de partida como del polímero hidrolizado resultante.
- 5 El polímero hidrolizado resultante precipitó en una masa blanca con la adición de iones fosfato o citrato, mientras que la disolución del material de partida no precipitó al añadir gota a gota iones fosfato o citrato, lo que indica que el material de partida no responde a un estímulo (p. ej., un anión multivalente como el fosfato o el citrato), mientras que el polímero de peso molecular muy alto sintetizado, como se describe en este ejemplo, responde a un estímulo (por ejemplo, un anión multivalente como el fosfato o el citrato).
- 10 La Figura 5 representa un proceso para la desprotección del polímero de poliamina, lo que da como resultado la formación de una polivinilamina (PVA) sensible a estímulos.

Ejemplo 32: Síntesis de un polímero sensible a estímulos de polivinilamina (PVA) modificado de manera hidrófoba basado en una poli(N-vinilacetamida) desprotegida

- Usando la PVA obtenida a partir de un homopolímero lineal de poli (N-vinilacetamida) desprotegida de 4.060 kDa del Ejemplo 31, se preparó un polímero sensible a estímulos modificado de manera hidrófoba de peso molecular muy alto como sigue.

- Se colocaron 100 g de una disolución al 2% de poli (N-vinilacetamida) desprotegida de 4.060 kDa en un recipiente de vidrio. Al recipiente de vidrio se le añadieron 100 g de NaOH 4 M para ajustar el pH a aproximadamente 13. A continuación, se añadieron 20 g de 1-propanol al recipiente como codisolvente. Finalmente, se añadieron 0,58 g de cloruro de bencilo y se cerró el recipiente. La reacción se calentó a 60 °C durante 3 horas con agitación vigorosa. Después de 3 horas, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el producto se precipitó con acetona y posteriormente se recogió. Los sólidos resultantes se lavaron con agua desionizada, seguido de alcohol isopropílico, y se secaron en un horno de vacío a 65 °C durante 2 días. Los sólidos secos se molieron hasta un polvo fino y la masa seca final del polímero recogido fue de 1,44 g. Se preparó una disolución al 2% disolviendo el polvo seco en ácido acético 1 M y HCl al 0,08%. La disolución resultante se ensayó para determinar la sensibilidad a un estímulo iónico multivalente mediante la adición gota a gota de fosfato de sodio 2 M o citrato de sodio 0,2 molar a muestras de 5 ml de disoluciones de polímero al 0,5%. Tras la adición de los iones fosfato o citrato se observa un precipitado blanco, lo que indica que el polímero fue sensible a un estímulo de anión multivalente.

La Figura 6 proporciona un esquema del proceso de síntesis descrito en este Ejemplo.

- 35 Ejemplo 33: Síntesis de un copolímero de vinilamina/vinilbutiléter sensible a estímulos (VA-co-VBE)

En otro experimento, se preparó un copolímero sensible a estímulos, en el que una de las unidades monoméricas incluyó un grupo hidrófobo.

- Se sintetizó un polímero sensible a estímulos compuesto por unidades repetidas que contenían aminas primarias y éter butílico a partir de monómeros como sigue. Se colocaron 90 g de octano, 2,5 g de Span-85 (SIGMA), 16 g de N-vinilformamida (NVF) (ALDRICH, 98%), 5 g de N-butilviniléter (SIGMA) y 30 g de agua desionizada en un matraz de fondo redondo de 250 ml. El matraz estaba equipado con un agitador magnético y una varilla de N<sub>2</sub>. La disolución se agitó y se purgó con N<sub>2</sub> durante 1 hora a medida que la temperatura se incrementó hasta 55 °C.

- La disolución de iniciador se preparó agregando 0,10 g de 2,2' Azobis(2-amidinopropano)dihidrocloruro (ABAP) (ALDRICH) a 10 ml de agua desionizada y disolviéndolo. La disolución de iniciador se cargó en el matraz de fondo redondo de 250 ml que contenía la disolución de reacción en una atmósfera purgada con nitrógeno. La disolución se calentó a 55 °C durante 1 hora, después se calentó a 60 °C durante 1 hora, después se calentó a 70 °C durante 1 hora y después se calentó a 80 °C durante 1 hora, con agitación vigorosa con una purga continua de nitrógeno. Esto dio como resultado una disolución de dos fases con una capa de gel viscoso en el fondo. La capa superior se decantó y se desechó. A la capa inferior se le añadieron 200 ml de agua desionizada, y se añadieron 20 g de NaOH al 50% con agitación vigorosa. La disolución se calentó a 80 °C durante 6 horas. Después de 6 horas, la disolución se retiró del calor y se dejó enfriar a temperatura ambiente. El volumen se aumentó a 2 L con agua desionizada. El producto se aisló mediante la adición gota a gota de fosfato de sodio 2 M, dando como resultado un gran precipitado blanco. El precipitado se recogió decantando el sobrenadante, y el precipitado se lavó con agua desionizada. El polímero aislado se disolvió en 500 ml de agua desionizada, 10 g de ácido acético y 2 g de HCl concentrado. La disolución resultante se ensayó para determinar la sensibilidad a un estímulo iónico multivalente mediante la adición gota a gota de fosfato de sodio 2 M o citrato de sodio 0,2 molar a muestras de 5 ml de disoluciones de polímero al 0,5%. Tras la adición de los iones fosfato o citrato, se observó un precipitado blanco, lo que indica que el polímero fue sensible a un estímulo de anión multivalente.

La Figura 7 representa un esquema de la reacción descrita en este ejemplo. Este ejemplo demuestra que los copolímeros que contienen una amina o una funcionalidad cargada copolimerizada con un monómero hidrófobo son sensibles a un estímulo de ion multivalente.

5 Ejemplo 34: Síntesis de un polímero sensible a estímulos de polivinilamina (PVA) de peso molecular muy alto a partir del monómero NVF mediante polimerización en emulsión inversa

Se sintetizó un polímero sensible a estímulos compuesto por unidades repetidas que contenían aminas primarias a partir de un monómero como sigue. Se colocaron 90 g de octano, 2,5 g de Span-85 (SIGMA), 16 g de N-vinilformamida (NVF) (ALDRICH, 98%) y 30 g de agua desionizada en un matraz de fondo redondo de 250 ml. El matraz estaba equipado con un agitador magnético y una varilla de N<sub>2</sub>. La disolución se agitó y se purgó con N<sub>2</sub> durante 1 hora a medida que la temperatura se incrementó hasta 55 °C. La disolución de iniciador se preparó añadiendo 0,20 g de 2,2' Azobis(2-amidinopropano)dihidrocloruro (ABAP) (ALDRICH) a 20 ml de agua desionizada y disolviéndolo. La disolución de iniciador se cargó en el matraz de fondo redondo de 250 ml que contenía la disolución de reacción en una atmósfera purgada con nitrógeno. La disolución se calentó a 60 °C durante 2 horas, seguido de calentamiento a 75 °C durante 1 hora con agitación vigorosa con purga continua de nitrógeno. Una disolución de dos fases da como resultado una capa de gel viscoso en el fondo. La capa superior se decanta y se desecha. A la capa inferior se le añaden 500 ml de agua desionizada, y se añaden 48 g de NaOH al 50% con agitación vigorosa. La disolución se calentó a 80 °C durante 16 horas. Después de 16 horas, la disolución se retiró del calor y se dejó enfriar a temperatura ambiente. El volumen se aumentó a 1 L con agua desionizada. El producto se aisló mediante la adición gota a gota de fosfato de sodio 2 M dando como resultado un precipitado blanco grande. El precipitado se recogió decantando el sobrenadante, y el precipitado se lavó con agua desionizada y se sumergió en alcohol isopropílico durante 2 horas y finalmente se lavó nuevamente con agua desionizada. La masa sólida resultante se secó en un horno de vacío a 65 °C durante 3 días. El polímero seco se congeló con nitrógeno líquido y se molió hasta un polvo fino, y se secó adicionalmente durante 1 día. La masa resultante del polvo seco fue de 21,5 g. Se preparó una disolución al 2% disolviendo el polvo seco en ácido acético 1 M y HCl al 0,08%. La disolución resultante se ensayó para determinar la sensibilidad a un estímulo de ion multivalente mediante la adición gota a gota de fosfato de sodio 2 M o citrato de sodio 0,2 M a muestras de 50 ml de disoluciones de polímero al 1%. Tras la adición de los iones fosfato o citrato se observa un precipitado blanco.

Ejemplo 35: Síntesis de un polímero sensible a estímulos de polivinilamina (PVA) modificado de manera hidrófoba de peso molecular alto

30 Usando una disolución de Lupamin 9095 (polivinilamina lineal, PM promedio = 340 kDa, 20% de sólidos, pH 7-9) obtenida de BASF, se produjo un polímero sensible a estímulos modificado de manera hidrófoba como sigue. Se añadieron 300 g de Lupamin 9095 (aproximadamente 60 g de polivinilamina) a un recipiente de vidrio de 2 litros. A continuación, se disolvieron 40 g de gránulos de NaOH y 500 ml de agua desionizada y se añadieron al recipiente. Esto fue seguido por la adición de 500 ml de 1,2-dimetoxietano (SIGMA) como codisolvente, y la disolución se agitó vigorosamente hasta homogeneidad. A continuación, se añadieron 17,66 g de cloruro de bencilo (ACROS ORGANICS, 99%) al recipiente de reacción con agitación. La disolución se calentó a 60 °C durante 16 horas con agitación magnética. La disolución se dejó enfriar posteriormente a temperatura ambiente y se transfirió a un vaso de precipitados de 5 litros. A continuación, se añadieron 1500 ml de agua desionizada con agitación. El pH se ajustó a 5 con ácido acético glacial. El producto se precipitó con una adición lenta de 250 ml de fosfato de sodio 2 M, y el sólido se recogió y se lavó con agua desionizada.

45 El polímero se purificó adicionalmente mediante el siguiente método. El sólido se disolvió en 2 litros de ácido acético 1 M con agitación. El volumen total se llevó a 10 litros con agua desionizada y el pH se ajustó a 7 con la adición gota a gota de NaOH al 50%. El producto se precipitó con la adición de 600 g de fosfato de sodio 2 M. El sólido se aisló mediante filtración a vacío y se lavó con agua desionizada. La masa sólida resultante se secó en un horno de vacío a 65 °C durante 3 días. El polímero seco se congeló con nitrógeno líquido y se molió hasta un polvo fino, y se secó adicionalmente durante 1 día. La masa resultante del polvo seco fue de 46 g. Una pequeña muestra se disolvió en 1 M de CD<sub>3</sub>COOD/D<sub>2</sub>O ácido, y se obtuvieron los espectros de <sup>1</sup>H-RMN, que se representan en la Figura 8. Los picos de <sup>1</sup>H-RMN se integraron y se determinó que la cantidad de modificación de bencilo fue del 18%.

50 Ejemplo 36: Síntesis a escala de 200 g de un polímero sensible a estímulos basado en polialilamina modificado de manera hidrófoba

En un experimento ejemplar descrito en la presente memoria, se demostró que los polímeros descritos en la presente memoria podrían fabricarse a gran escala.

55 Usando una disolución de polialilamina (PAA, NITTOBO, 150 kD; 40% peso/peso), se produjo un polímero sensible a estímulos modificado de manera hidrófoba como sigue. Se añadieron 500 g de polialilamina (PAA, NITTOBO, 150 kD; 40% peso/peso) (aproximadamente 200 g de polialilamina) a un recipiente de vidrio de 4 litros. A continuación, se disolvieron 80 g de gránulos de NaOH y 1000 ml de agua desionizada y se añadieron al recipiente. Seguido de la adición de 1000 ml de 1,2-dimetoxietano (SIGMA) como codisolvente, y la disolución se agitó vigorosamente hasta homogeneidad. A continuación, se añadieron 114 g de cloruro de bencilo (ACROS ORGANICS, 99%) al recipiente de reacción. La disolución se calentó a 60 °C durante 16 horas con agitación magnética. La disolución se dejó enfriar a

temperatura ambiente y se transfirió a un vaso de precipitados de 10 litros.

A continuación, se añadieron 1000 ml de agua desionizada con agitación, y precipitó una masa sólida pegajosa de la disolución. El producto se precipitó adicionalmente con la adición lenta de 200 ml de fosfato de sodio 2 M, y el sólido se recogió y se lavó con agua desionizada. El polímero se purificó adicionalmente mediante el siguiente método. El sólido se disolvió en 3 litros de ácido acético 1 M con agitación. El volumen total se llevó a 10 litros con agua desionizada y el pH se ajustó a 7 con la adición gota a gota de NaOH al 50%. El producto se precipitó con la adición de 800 g de fosfato de sodio 2 M y los sólidos se recogieron y se lavaron con agua desionizada. El polímero se purificó aún más mediante el siguiente método. El sólido se disolvió en 3 litros de ácido acético 1 M con agitación. El volumen total se llevó a 10 litros con agua desionizada y el pH se ajustó a 7 con la adición gota a gota de NaOH al 50%. El producto se precipitó con la adición de 800 g de fosfato de sodio 2 M y los sólidos se recogieron y se lavaron con agua desionizada. La masa sólida resultante se secó en un horno de vacío a 65 °C durante 3 días. El polímero seco se congeló con nitrógeno líquido y se molió hasta un polvo fino, y se secó adicionalmente durante 1 día. La masa resultante del polvo seco fue de 250 g. Una pequeña muestra se disolvió en 1 M de CD<sub>3</sub>COOD/D<sub>2</sub>O ácido y se obtuvieron los espectros de <sup>1</sup>H-RMN, como se muestra en la Figura 9. Los picos de <sup>1</sup>H-RMN se integraron y se determinó que la cantidad de modificación de bencilo fue del 33%.

Ejemplo 37: Determinación del rendimiento de la floculación y la calidad del sobrenadante para dosis crecientes de un polímero sensible a estímulos frente a un polielectrolito catiónico en un cultivo de células CHO

En un experimento ejemplar descrito en la presente memoria, los polímeros sensibles a estímulos descritos en la presente memoria se compararon con un polímero conocido, es decir, quitosano, con respecto a ciertas propiedades deseables.

El cultivo de células CHO se preparó usando un método, como se describe en el Ejemplo 1. Se preparó una disolución al 2% p/p de quitosano de peso molecular medio (quitosano PMM) (Sigma-Aldrich) en ácido acético 1 M. Se preparó una disolución al 2% p/p de polímero (33%-BnPAA) sensible a estímulos basado en polialilamina modificado de manera hidrófoba de acuerdo con el Ejemplo n° 36. Se dispensaron 10 ml del cultivo de células CHO en tubos cónicos de 15 ml. Se añadieron dosis individuales de polímero de 0,0, 0,1, 0,2, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,14, 0,18, 0,22 y 0,4% p/v a cada tubo cónico que contenía el cultivo de células CHO para cada quitosano PMB y 33%-BnPAA. Para los tubos cónicos que contenían solo el 33%-BnPAA, el pH se ajustó a 7,2 y se aplicó un estímulo de fosfato de sodio 150 mM. Todos los tubos cónicos se centrifugaron a 3000 RPM durante 2 minutos y se decantó el sobrenadante y se determinó la turbidez.

La Tabla 5 a continuación y la Figura 10 resumen los resultados de un experimento representativo para demostrar que un polímero sensible a estímulos (por ejemplo, quitosano) requiere una optimización de la dosis para una floculación eficiente, mientras que un polímero sensible a estímulos útil en la presente invención no parece requerir una optimización de la dosis. En otras palabras, en el caso de un polímero que no es sensible a estímulos, como el quitosano, una vez que se añade una dosis óptima del polímero para una floculación eficiente, exceder esa dosis óptima da como resultado un aumento de la turbidez, lo que es indeseable. Mientras tanto, en el caso de los polímeros sensibles a estímulos, como los descritos en la presente memoria, el polímero sensible a estímulos continúa siendo un floculante/precipitante eficaz independientemente del aumento de la dosis.

Tabla 5

Dosis de floculante polimérico %(p/v)	Floculante polimérico	Estímulo (s/n)	Turbidez del sobrenadante (NTU)
0	Quitosano PMM	n	266
0,01	Quitosano PMM	n	14
0,02	Quitosano PMM	n	13
0,03	Quitosano PMM	n	28
0,04	Quitosano PMM	n	200
0,05	Quitosano PMM	n	282
0,06	Quitosano PMM	n	311
0,07	Quitosano PMM	n	325
0,08	Quitosano PMM	n	353
0,09	Quitosano PMM	n	378
0,1	Quitosano PMM	n	379
0,14	Quitosano PMM	n	404
0,18	Quitosano PMM	n	409
0,22	Quitosano PMM	n	405

## ES 2 754 210 T3

0,4	Quitosano PMM	n	400
0	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	s	237
0,01	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	s	399
0,02	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	s	486
0,03	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	s	433
0,04	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	s	293
0,05	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	y	42
0,06	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	s	19
0,07	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	s	14
0,08	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	s	16
0,09	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	s	21
0,1	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	s	20
0,14	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	s	17
0,18	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	s	17
0,22	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	s	12
0,4	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	s	14

Ejemplo 38: Determinación del rendimiento de floculación y la calidad del sobrenadante con dosis crecientes de un polímero sensible a estímulos en presencia de un estímulo de anión multivalente respecto de la ausencia de estímulo, en cultivo de células CHO

- 5 El cultivo de células CHO se preparó usando un método, como se describe en el Ejemplo 1. Se preparó una disolución al 2% p/p de polímero (33%-BnPAA) sensible a estímulos basado en polialilamina modificado de manera hidrófoba de acuerdo con el Ejemplo nº 36. Se añadieron dosis individuales de polímero de 0,0, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,14, 0,18, 0,22 y 0,4% p/v a cada tubo cónico que contenía el cultivo de células CHO por triplicado (uno para fosfato y otro para citrato, y uno sin estímulo) para el polímero 33%-BnPAA. El pH se ajustó a 7,2 y se aplicó un estímulo de fosfato de sodio 150 mM o citrato de sodio 150 mM, o no se aplicó ningún estímulo. Todos los tubos cónicos se centrifugaron a 3000 RPM durante 2 minutos y se decantó el sobrenadante y se determinó la turbidez del concentrado. Los resultados de los experimentos descritos en este ejemplo se muestran en la Tabla 6 y la Figura 11.

- 15 La Tabla 6 y la Figura 11 resumen los resultados de un experimento representativo para demostrar que un polímero sensible a estímulos (por ejemplo, descrito en el Ejemplo 36) puede funcionar como floculante insensible a estímulos (similar a los datos de quitosano del Ejemplo 37), que requiere la optimización de la dosis de polímero sin un estímulo. Sin embargo, con un estímulo de ion multivalente, como fosfato o citrato, el polímero sensible a estímulos no requiere la optimización de la dosis, ya que la turbidez del concentrado no se ve afectada al aumentar la dosis de polímero.

Tabla 6

Dosis de floculante polimérico %(p/v)	Floculante polimérico	Estímulo (fosfato/citrato/ninguno)	Turbidez del sobrenadante (NTU)
0	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	fosfato	237
0,05	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	fosfato	42
0,06	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	fosfato	19
0,07	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	fosfato	14
0,08	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	fosfato	16
0,09	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	fosfato	21
0,1	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	fosfato	20
0,14	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	fosfato	17
0,18	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	fosfato	17
0,22	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	fosfato	12
0,4	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	fosfato	14
0,05	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	citrato	50
0,06	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	citrato	29

0,07	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	citrato	27
0,08	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	citrato	23
0,09	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	citrato	30
0,1	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	citrato	21
0,14	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	citrato	19
0,18	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	citrato	24
0,22	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	citrato	23
0,4	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	citrato	20
0,05	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	ninguno	64
0,06	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	ninguno	33
0,07	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	ninguno	23
0,08	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	ninguno	46
0,09	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	ninguno	51
0,1	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	ninguno	55
0,14	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	ninguno	199
0,18	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	ninguno	492
0,22	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	ninguno	454
0,4	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	ninguno	455

Ejemplo 39: Determinación del rendimiento de floculación y calidad del sobrenadante con dosis crecientes de un polímero sensible a estímulos sin modificar en cultivo de células CHO

5 En otro experimento, se determinó la capacidad de floculación y la calidad del sobrenadante con un polímero sensible a estímulos sin modificar en un cultivo de células CHO, como se describe en la presente memoria.

10 El cultivo de células CHO se preparó usando un método, como se describe en el Ejemplo 1. Se preparó una disolución al 2% p/p de polímero sensible a estímulos a base de polialilamina sin modificar disolviendo polialilamina (PAA, NITTOBO, 150 kD; 40% peso/peso) en ácido acético 1 M. Se dispensan 10 ml del cultivo de células CHO en tubos cónicos de 15 ml. Se añadieron dosis individuales de polímero de 0,0, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,14, 0,18, 0,22 y 0,4% p/p a cada tubo cónico que contenía cultivo de células CHO. El pH se ajustó a 7,2 y se aplicó un estímulo de fosfato de sodio 150 mM. Todos los tubos cónicos se centrifugaron a 3000 RPM durante 2 minutos y se decantó el sobrenadante y se determinó la turbidez. Los resultados de los experimentos descritos en este ejemplo se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Dosis de floculante polimérico %(p/v)	Floculante polimérico	Estímulo (s/n)	Turbidez del sobrenadante (NTU)
0,05	Polialilamina de 150 kD sin modificar	n	171
0,06	Polialilamina de 150 kD sin modificar	n	426
0,07	Polialilamina de 150 kD sin modificar	n	673
0,08	Polialilamina de 150 kD sin modificar	n	959
0,09	Polialilamina de 150 kD sin modificar	n	947
0,1	Polialilamina de 150 kD sin modificar	n	> 1000
0,14	Polialilamina de 150 kD sin modificar	n	> 1000
0,18	Polialilamina de 150 kD sin modificar	n	> 1000
0,22	Polialilamina de 150 kD sin modificar	n	> 1000
0,4	Polialilamina de 150 kD sin modificar	n	> 1000

15

Ejemplo 40: Determinación del rendimiento de floculación, tiempo de sedimentación y calidad del sobrenadante de un polímero sensible a estímulos en cultivo de células CHO

5 El cultivo de células CHO se preparó usando un método como se describió en el Ejemplo 1. Se preparó una disolución al 10% p/p de un polímero (33%-BnPAA) sensible a estímulos basado en polialilamina modificado de manera hidrófoba similar al Ejemplo nº 36. Se colocaron 50 ml de cultivo de células CHO en una probeta de vidrio de 100 ml por duplicado. En una de las probetas, el polímero sensible a estímulos se añadió a una dosis del 0,5%, el pH se ajustó a 7 con la adición gota a gota de Tris-base 2 M, la concentración de fosfato de sodio se ajustó a 50 mM mediante la adición de una disolución de fosfato de sodio 2 M, y la disolución se agitó durante 2 minutos. El fosfato de sodio y el ajuste del pH se realizaron para precipitar el polímero sensible a estímulos y un complejo de células, restos celulares, impurezas, polímero residual; para flocular los sólidos; y para aumentar el tamaño de partícula. Después de la adición de fosfato de sodio y el ajuste del pH, se observaron partículas agregadas grandes en la alimentación tratada con polímero sensible a estímulos. La otra probeta se agitó durante 2 minutos y no se añadió nada. Ambas probetas se dejaron reposar sin perturbaciones durante 1 hora. Al final de una hora, se aspiró el sobrenadante y se registró la turbidez.

10

15 Se observó que la fase sólida de la probeta con el polímero inteligente se asienta más rápido, así como un frente de sedimentación definido (transición aguda de fase sólida a líquida) respecto de la fase sólida de la probeta sin tratar, lo que dio un frente de sedimentación indefinido.

Los resultados de uno de estos experimentos se resumen en la Tabla 8. Las mediciones con respecto a los frentes de sedimentación fueron una estimación aproximada de la probeta sin tratar, porque el frente de sedimentación era en gran parte disperso e indefinido.

20

Tabla 8

Tiempo (minutos)	Polímero	Frente de sedimentación (% de sólidos)	Turbidez final del sobrenadante (NTU)
10	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	100	
20	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	100	
30	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	62	
40	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	50	
50	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	47	
60	Polialilamina modificada con bencilo al 33%	42	18
10	Ninguno	100	
20	Ninguno	100	
30	Ninguno	95	
40	Ninguno	93	
50	Ninguno	88	
60	Ninguno	84	589

Ejemplo 41: Comparación del rendimiento de clarificación utilizando poliaminas de diferentes pesos moleculares

25 Se obtuvieron, modificaron y usaron una serie de polímeros con diferentes pesos moleculares para flocular, precipitar y purificar un cultivo celular. Los polímeros con unidades repetitivas de aminas primarias de pesos moleculares de 15 kD, 85 kD, 150 kD, 350 kD, 600-950 kD y 2000-4000 kD se obtuvieron y/o modificaron mediante los siguientes métodos.

30 El polímero de polialilamina de 15 kD se obtuvo de NITTOBO y se benciló (se unieron covalentemente grupos bencilo y se purificó) usando un método similar al del Ejemplo 36. El polímero de polivinilamina bencilada de 85 kD se preparó mediante el Ejemplo 23. La polialilamina bencilada de 150 kD se preparó de acuerdo con el Ejemplo 36. El polímero de polivinilamina bencilada de 350 kD se preparó mediante el Ejemplo 35. El esqueleto del polímero de polivinilamina de 950 kD se prepara hidrolizando Polymin VZ (BASF) con 2 equivalentes de base a 80 °C durante 8 horas. El PVA de 2000-4000 kD sin modificar se preparó de acuerdo con el Ejemplo 31. El polímero bencilado de 2000-4000 kD se preparó de acuerdo con el Ejemplo 32. Los polímeros se utilizan para flocular, precipitar y purificar un cultivo de células CHO DG44 de aproximadamente  $12 \times 10^6$  células/ml y una viabilidad de células recolectadas de < 50%. La floculación se realizó a dosis de polímero de 0,2% y 0,4% p/p. Se aplicó un estímulo de disolución de fosfato de sodio 50 mM y un ajuste del pH a 7 con Tris-base 2 M.

35

Se registraron las observaciones sobre el tamaño de floculación, y se indican como + para floculaciones pequeñas y +++++ para floculaciones muy grandes. Los viales indicados con +++++ fueron más bien una separación de zona

completa que una suspensión de agregados. También se observa que los agregados/partículas más grandes se depositan más rápido con una interfase líquido-sólido más nítida. Los resultados se muestran en la Tabla 9, que demuestra los resultados para la floculación usando poliaminas de diferentes pesos moleculares.

Tabla 9.

Peso Molecular (kD)	Dosis de polímero (p/p)	Agregado/Tamaño de partículas
15	0,2	+
85	0,2	+
150	0,2	++
350	0,2	+++
600-900	0,2	+++
2000-4000	0,2	++++
15	0,4	+
85	0,4	+
150	0,4	+++
350	0,4	++++
600-900	0,4	++++
2000-4000	0,4	+++++

5

Ejemplo 42: Comparación del rendimiento de clarificación utilizando poliaminas con diferentes modificaciones hidrófobas.

El cultivo de células CHO se preparó usando un método, como se describe en el Ejemplo 1. Se añadieron muestras de los polímeros descritos en los Ejemplos 31, 32, 33 y 35 al cultivo celular como se describe en el Ejemplo 38 con las siguientes excepciones: La dosis de polímero fue de entre un 0,1% en peso y un 0,6% en peso como se describe en la Tabla 10. La turbidez del cultivo celular inicial fue de 900 NTU, y el concentrado sin tratamiento con polímero tuvo una turbidez de 212 NTU. El pH se ajustó a 7,2 y se aplicó un estímulo de fosfato de sodio 50 mM. Todos los tubos cónicos se centrifugaron a 3000 RPM durante 2 minutos, y se decantó el sobrenadante y se determinó la turbidez central. Los resultados de los experimentos descritos en este ejemplo se muestran en la Tabla 10, que demuestra el rendimiento de diferentes modificaciones hidrófobas a diferentes dosis de polímero.

15

La Tabla 10 demuestra que al cambiar la naturaleza del grupo hidrófobo y/o el peso molecular del polímero, la respuesta al estímulo y la turbidez del concentrado resultante pueden variar.

Tabla 10.

Polímero	Dosis de polímero (p/p)	Turbidez del concentrado (NTU)
Sin tratar (sin polímero)	0	212
Ejemplo 31	0,2	12
Ejemplo 31	0,6	76
Ejemplo 32	0,2	92
Ejemplo 32	0,6	26
Ejemplo 33	0,2	17
Ejemplo 33	0,6	61
Ejemplo 35	0,1	19
Ejemplo 35	0,2	12
Ejemplo 35	0,4	36
Ejemplo 35	0,6	32

20 Ejemplo 43: Efecto de la turbidez reducida obtenida con polímeros sensibles a estímulos sobre la filtración posterior

Para evaluar el efecto del polímero sensible a estímulos sobre las etapas posteriores de centrifugación y filtración en profundidad, se siguió el siguiente procedimiento. La línea celular de ovario de hámster chino DG44 (CHO) que

expresaba el anticuerpo PTG1 se cultivó en un biorreactor de 10 L (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC) a una densidad de aproximadamente  $15 \times 10^6$  células/ml y se recolectó a  $< 50\%$  de viabilidad. Se prepara una disolución al 10% p/p de un polímero (33%-BnPAA) sensible a estímulos basado en polialilamina modificado de manera hidrófoba similar al Ejemplo nº 36.

- 5 Una fracción del cultivo celular DG44 CHO se trata con un 0,2% del polímero sensible a estímulos 33%-BnPAA, mientras que otra fracción del cultivo celular DG44 CHO no se trata. Para el cultivo celular tratado con polímero sensible a estímulos, la concentración de fosfato de sodio se lleva a 50 mM mediante la adición gota a gota de fosfato de sodio 2 M, y el pH se ajusta a 7,2 mediante la adición gota a gota de Tris-base 2 M. El fosfato de sodio y el ajuste del pH se realizan para precipitar el polímero sensible a estímulos y un complejo de células, restos celulares, impurezas, polímero residual, y para flocular los sólidos, y aumentar el tamaño de partícula. Después de la adición de fosfato de sodio y del ajuste del pH, se observan grandes partículas floculadas en la alimentación tratada con polímero sensible a estímulos. Ambas fracciones se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 RPM, y los sobrenadantes se decantaron y se determinó la turbidez. Se determinó que la turbidez del concentrado para la alimentación tratada con polímero 33%-BnPAA fue de 10 NTU, mientras que la turbidez del concentrado para la alimentación sin tratar fue de 60 NTU.

El rendimiento del filtro de profundidad para cada alimentación se determinó mediante el siguiente método. Se usó un filtro de profundidad desechable en cápsula X0HC Millistak+® (MILLIPORE) con una superficie de 23 cm<sup>2</sup> para cada alimentación. Los filtros de profundidad estaban equipados con una bomba peristáltica y un sensor de presión en línea. Los filtros se lavaron con agua desionizada de acuerdo con las instrucciones, y la alimentación se bombeó a 100 LMH y los filtrados se combinaron. La turbidez combinada para el filtrado de alimentación tratado con polímero 33%-BnPAA fue de 6 NTU, y la turbidez combinada para el filtrado de alimentación sin tratar fue de 9 NTU. El rendimiento del filtro para la alimentación tratada con polímero 33%-BnPAA fue de 1304 L/m<sup>2</sup> a 10 psi, momento en el cual el experimento se detuvo debido a las limitaciones de alimentación. El rendimiento del filtro para la alimentación sin tratar fue de 206 L/m<sup>2</sup> a 20 psi, momento en el cual el experimento se detuvo debido a las limitaciones de presión.

- 25 Ejemplo 44: Purificación de una corriente de proteína modelo con un polímero sensible a estímulos seguido de captura con una resina de afinidad

Para evaluar mejor el efecto del polímero sensible a estímulos en las etapas de purificación posteriores, se preparó un modelo de alimentación y se siguió el siguiente procedimiento. El cultivo de células CHO se prepara usando un método similar al Ejemplo 1. Nivel de HCP de alimentación inicial ~ 210.000 ppm. Se prepara una disolución al 10% p/p de un polímero (33%-BnPAA) sensible a estímulos basado en polialilamina modificado de manera hidrófoba similar al Ejemplo nº 36. Una fracción del cultivo de células CHO se trata con un 0,1% del polímero sensible a estímulos 33%-BnPAA, mientras que otra fracción del cultivo de células CHO se trata con un 0,4% del polímero sensible a estímulos 33%-BnPAA, y una tercera fracción del cultivo de células CHO no se trata. Para los cultivos celulares tratados con polímeros sensibles a estímulos, la concentración de fosfato de sodio se lleva a 50 mM mediante la adición gota a gota de fosfato de sodio 2 M, y el pH se ajusta a 7,2 mediante la adición gota a gota de Tris-base 2 M. El fosfato de sodio y el ajuste del pH se realizan para precipitar el polímero sensible a los estímulos y un complejo de células, restos celulares, impurezas, polímero residual, y para flocular los sólidos, y aumentar el tamaño de partícula. Después de la adición de fosfato de sodio y el ajuste del pH, se observan grandes partículas floculadas en las alimentaciones tratadas con polímero sensible a estímulos. Cada fracción del cultivo celular se centrifuga en una centrifuga de cubetas a escala de laboratorio durante 5 minutos a 3000 RPM. La turbidez de cada concentrado se registra y se informa en la Tabla 11. Los concentrados se filtran a través de un filtro Durapore® de 0,2 µm.

Las mezclas de filtrados se purificaron mediante una purificación de cromatografía de tres etapas que consistió en cromatografía de afinidad con proteína A (ProSep Ultra Plus®), cromatografía de intercambio catiónico de unión y elución (ProRes S®) y cromatografía de intercambio aniónico con adsorbente de membrana en modo de flujo continuo (ChromaSorb®). La purificación se realizó en una estación de trabajo de cromatografía de acuerdo con el método de la Tabla 12. Las mezclas para cada etapa se analizaron con respecto a la proteína de la célula huésped (CHOP) mediante ELISA, la proteína A lixiviada (L ProA) mediante ELISA, el ADN residual mediante un ensayo PicoGreen®, la turbidez, el porcentaje de proteína agregada (AGG) mediante HPLC de exclusión por tamaño y la concentración de proteína mediante absorción UV.

50

ES 2 754 210 T3

Tabla II.

Tratamiento de la alimentación	Concentrado (NTU)	Recuperación de Mab (%)	Eliminación de CHOP (%)			ADN (µg/mL)
Centrífuga solamente	127	100	0			49
0,1% de Bn25PAA	7,3	90	50			<LOQ
0,4% de Bn25PAA	9,2	78	50			<LOQ
Mezclas de proteína A						
Tratamiento de la alimentación	Inactivación de virus, mezcla de retención del pH bajo (NTU)	Rendimiento de la etapa (%)	[CHOP] (ppm)	AGG %	L ProA (ppm)	ADN (µg/mL)
Centrífuga solamente	45	99	2135	3	> 25	0,84
0,1% de Bn25PAA	2,4	99	507	2,9	12	<LOQ
0,4% de Bn25PAA	2	100	267	3	> 25	<LOQ
Centrífuga solamente	87	684	2,3	<LOQ	<LOQ	
0,1% de Bn25PAA	91	282	24	<LOQ	<LOQ	
0,4% de Bn25PAA	86	133	2,4	<LOQ	<LOQ	
Mezclas ChromaSorb						
Tratamiento de la alimentación			Rendimiento de la etapa (%)	[CHOP] (ppm)	L ProA	ADN (µg/mL)
Centrífuga solamente			93	1,0 o <LOQ	<LOQ	<LOQ
0,1% de Bn25PMA			96	0,7 o <LOQ	<LOQ	<LOQ
0,4% de Bn25PAA			95	0,7 o <LOQ	<LOQ	<LOQ

ES 2 754 210 T3

Tabla 12.

Proteína A			
Dimensiones de la columna	0,66 x 14 cm		
Método			
Etapa	Tampón	Duración (volúmenes de columna)	Tiempo de residencia
EQ	Solución salina tamponada con fosfato	5	3
Carga	0,9 mg/mL de alimentación clarificada	214 ml	4
Lavado	Solución salina tamponada con fosfato	9	3
Elución	Ácido acético 50 mM, pH 3,0	6	3
Arrastre con ácido	Ácido fosfórico 150 mM	3	3
EQ	Solución salina tamponada con fosfato	5	3
Intercambio catiónico			
Dimensiones de la columna	0,66 x 14 cm		
Método			
Etapa	Tampón	Duración (volúmenes de columna)	Tiempo de residencia
EQ	Ácido acético 50 mM. NaCl 25 mM, pH 5,0	3	3
Carga	Mezcla de elución de proteína A ajustada a pH 5 con ácido acético 50 mM. NaCl 25 mM, pH 5,0	densidad de carga = 40 mg/ml	4
Lavado	Ácido acético 50 mM, NaCl 25 mM, pH 5,0	3	3
Elución	Ácido acético 50 mM. NaCl 125 mM, pH 5,0	6	3
Arrastre con NaCl	Ácido acético 50 mM, NaCl 500 mM, pH 5,0	3	3
Lavado con NaOH	NaOH 0,5 M	3	3
EQ	Ácido acético 50 mM, NaCl 25 mM, pH 5,0	15	3
Intercambio aniónico			
Mezclas ChromaSorb 0,08 ml			
Método			
Etapa	Tampón	Duración (volúmenes de columna)	Caudal (ml/minuto)
EQ	Tris 50 mM, pH 7,4	300	1
Carga	Mezcla de intercambio catiónico ajustada con tris 50 mM, pH 7,4	Densidad de carga = 2 5 kg/L	1

Ejemplo 45: Purificación de una corriente de proteína modelo con un polímero sensible a estímulos seguido de captura con una resina de intercambio catiónico

5 Para evaluar mejor el efecto del polímero sensible a estímulos en las etapas de purificación posteriores, se siguió el siguiente procedimiento. La línea celular DG44 de ovario de hámster chino (CHO) que expresaba el anticuerpo PTG1 se cultivó en un biorreactor 101 (New Brunswick Scientific) a una densidad de aproximadamente  $15 \times 10^6$  células/ml, y se recolectó a < 50% de viabilidad con un nivel de HCP de ~ 142000 ppm.

10 Se preparó una disolución al 10% p/p de un polímero (33%-BnPAA) sensible a estímulos basado en polietilamina modificado de manera hidrófoba similar al Ejemplo nº 36. Una fracción del cultivo de células CHO se trató con un 0,1% de polímero sensible a estímulos 33%-BnPAA, mientras que otra fracción del cultivo de células CHO se trató con un 0,4% de polímero sensible a estímulos 33%-BnPAA, y una tercera fracción del cultivo celular de CHO no se trató. Para los cultivos celulares tratados con polímeros sensibles a estímulos, la concentración de fosfato de sodio se llevó a 50 mM mediante la adición gota a gota de fosfato de sodio 2 M, y el pH se ajustó a 7,2 mediante la adición gota a gota de Tris-base 2 M. El fosfato de sodio y el ajuste del pH se realizaron para precipitar el polímero sensible a estímulos y un complejo de células, restos celulares, impurezas, polímero residual, y para flocular los sólidos, y aumentar el tamaño de partícula. Después de la adición de fosfato de sodio y del ajuste del pH, se observan grandes partículas agregadas en las alimentaciones tratadas con polímero sensible a estímulos. Cada fracción del cultivo celular se centrifuga en una centrífuga de cubetas a escala de laboratorio durante 5 minutos a 3000 RPM. La turbidez de cada concentrado se registra y se informa en la Tabla 13. Los concentrados se filtraron a través de un filtro Durapore® de 0,2 µm.

20 Las mezclas de filtrados se purificaron mediante una purificación basada en cromatografía de dos etapas que consistió en cromatografía de intercambio catiónico de unión y elución (ProRes S®) y cromatografía de intercambio aniónico de adsorbente de membrana en modo de flujo continuo (ChromaSorb®). La purificación se realizó en una estación de trabajo de cromatografía de acuerdo con el método de la Tabla 12. Las mezclas para cada etapa se analizaron con respecto a la proteína de la célula huésped (CHOP) mediante ELISA, la proteína A lixiviada (L ProA) mediante ELISA, el ADN residual mediante un ensayo PicoGreen®, la turbidez, el porcentaje de proteína agregada (AGG) mediante HPLC de exclusión por tamaño y la concentración de proteína mediante absorción UV.

Tabla 13.

Tratamiento de la alimentación	Concentrado (NTU)	Recuperación de Mab (%)	Eliminación de CHOP (%)	ADN (µg/mL)
sin tratamiento	> 1000	100	0	11,9
0,1% de polímero	2	92	56	<LOQ
0,4% de polímero	12	90	65	<LOQ
Mezclas CEX				
Tratamiento de la alimentación	Rendimiento de la etapa (%)	[CHOP] (ppm)	Agr. (%)	ADN (µg/mL)
0,1% de polímero	80	897	< 0,1	<LOQ
0,4% de polímero	84	500	< 0,1	<LOQ
Mezclas ChromaSorb				
Tratamiento de la alimentación	Rendimiento de la etapa (%)	[CHOP] (ppm)		ADN (µg/mL)
0,1% de polímero	96	270		<LOQ
0,4% de polímero	97	225		<LOQ

Ejemplo 46: Superficie de una membrana de polietileno modificada con ácido fosfórico-metacrilato de 2-hidroxietilo (PAHEMA)

30 En otro experimento, se modificó una membrana para incorporar un estímulo de ion multivalente, donde la membrana se puede usar para eliminar el polímero sensible a estímulos residual.

35 Se preparó una mezcla acuosa de PAHEMA al 16% de acuerdo con la siguiente receta: 16 g de PAHEMA (Aldrich nº 695890, 75% de PAHEMA y 25% de BisHEMPA), 0,2 g de Irgacure 2959, 93,8 g de agua. Una membrana de polietileno (0,65 µm, UPDP MILLIPORE) se humedeció previamente con metanol y se intercambió en agua y se trató con la formulación de PAHEMA. La muestra se expuso a la luz UV, se lavó con metanol y agua, y se secó. El peso añadido a la membrana mediante esta modificación de la superficie fue del 4,4%. El espectro infrarrojo de la membrana mostró

una fuerte absorción del carbonilo del metacrilato. La tinción de la membrana con azul de metileno (un tinte cargado positivamente) dio un color azul profundo con una densidad óptica cian de 1,43.

Ejemplo 47: Superficie de una membrana de polietileno hidrófila modificada con ácido fosfórico-metacrilato de 2-hidroxietilo (PAHEMA)

5 Se preparó una mezcla acuosa de PAHEMA al 16% de acuerdo con la siguiente receta: 16 g de PAHEMA (Aldrich nº 695890, 75% de PAHEMA y 25% de BisHEMPA), 0,2 g de Irgacure 2959, 93,8 g de agua. Una membrana hidrófila (0,65 µm, MPLC MILLIPORE) se puso en contacto directamente con la disolución de PAHEMA. La exposición a los rayos UV y el lavado como se indicó anteriormente dieron una membrana con un añadido del 7,6%. El espectro infrarrojo de la membrana mostró una fuerte absorción del carbonilo del metacrilato. La tinción de la membrana con azul de metileno (un tinte cargado positivamente) dio un color azul profundo con una densidad óptica cian de 1,45.

Ejemplo 48: Resina de polimetacrilato hidrófila modificada con ácido fosfórico-metacrilato de 2-hidroxietilo (PAHEMA)

En otro experimento, se modificó una resina para incluir un estímulo, donde la resina modificada podría usarse para eliminar el polímero residual.

15 Se prepara una disolución con la siguiente composición: 60 ml de alil glicidil éter (AGE), 110 g de NaOH 4 M, 12 g de sulfato de sodio. A esta disolución se le añaden 60 ml de medio ToyoPearl65C y la mezcla se coloca en un hibridador rotatorio a 50 °C durante 16 horas. Los medios se separan y se lavan mediante procedimientos habituales. La disolución de injerto de PAHEMA se prepara de la siguiente manera: 1,0 g de PAHEMA, 0,06 g de persulfato de amonio, 9,0 g de agua. A esta disolución se le añaden 5 ml del medio ToyoPearl modificado con AGE. La mezcla se coloca en un hibridador a 80 °C durante 16 horas. La separación y el lavado mediante procedimientos habituales proporciona la resina modificada con PA-HEMA. Este producto se tiñe de azul oscuro cuando se trata con una disolución acuosa de azul de metileno al 0,01%, que es un tinte cargado positivamente.

Ejemplo 49; Unión de polímero sensible a estímulos con una superficie de membrana de polietileno hidrófila modificada con ácido fosfórico-metacrilato de 2-hidroxietilo (PAHEMA)

25 La membrana MPLC modificada con PAHEMA (Ejemplo 47) se usó para capturar el polímero de polialilamina (PAA) a partir de 3 disoluciones que contenían 100, 10 y 1 ppm de PAA, respectivamente, usando el siguiente procedimiento experimental. Un disco de membrana de 20 mm de diámetro se procesó en un soporte de cubetas de 15 cc. Las disoluciones de PAA se procesaron a 1,5 cc/seg. La membrana se lavó dentro y fuera del soporte de cubetas con 100 ml de tampón PBS. La membrana procesada se tiñó con Ponceau S.

30 Ponceau S es un tinte con carga negativa que se absorbe fuertemente en superficies con carga positiva. Cuando la membrana modificada con PAHEMA absorbe PAA, la superficie se convierte de una carga negativa a una positiva. Esta conversión se observa fácilmente al teñir la disolución procesada con Ponceau S. Una buena medida del grado de tinción con Ponceau S es la densidad óptica magenta medida con un densitómetro Macbeth. Los valores de densidad óptica magenta para varias membranas procesadas (es decir, cargadas con PAA) en los lados anterior y posterior de la membrana se muestran en la Tabla 14.

35 Como se puede ver para el caso de 1 ppm, todo el PAA se captura en el lado anterior de la membrana. Para los 15 ml de disolución procesada, esto corresponde a 4,8 microgramos de PAA/cm<sup>2</sup> de superficie de membrana.

Tabla 14.

Carga de PAA (PAA procesado)	Densidad óptica magenta anterior (superior)	Densidad óptica magenta posterior (inferior)
Sin procesar	0	0
100 ppm	0,77	0,77
10 ppm	0,75	0,70
1 ppm	0,60	0

40 En consecuencia, basándose en los resultados de este ejemplo, se puede concluir que las membranas y resinas modificadas descritas en la presente memoria pueden usarse para reducir el nivel de polímero residual o eliminar completamente el polímero residual.

La memoria descriptiva se comprende más a fondo a la luz de las enseñanzas de las referencias citadas en la memoria descriptiva.

45 Las realizaciones dentro de la memoria descriptiva proporcionan una ilustración de las realizaciones de esta invención, y no debe interpretarse que limiten su alcance; el experto en la técnica reconoce fácilmente que muchas otras realizaciones están abarcadas en esta invención.

La cita de cualquiera de las referencias en la presente memoria no es una admisión de que dichas referencias sean la técnica anterior a la presente invención.

5 A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, cultivo celular, condiciones de tratamiento, etc., que se usan en la memoria descriptiva, incluidas las reivindicaciones, deben entenderse como 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 pretendan obtener mediante la presente invención. A menos que se indique de otra manera, el término "al menos" que precede a una serie de elementos debe entenderse que se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar utilizando simplemente la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente memoria. Se  
10 pretende que tales equivalentes estén abarcados por las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para separar una molécula objetivo de una o más impurezas en una muestra, en el que el método comprende las etapas de:
  - (a) proporcionar una muestra que comprende una molécula objetivo y una o más impurezas;
  - 5 (b) poner en contacto la muestra con un polímero soluble sensible a estímulos que comprende un esqueleto de polielectrolito que comprende uno o más grupos hidrófobos unidos al esqueleto, en el que el polímero es capaz de unirse y precipitar una biomolécula de interés en una muestra tras la adición de un estímulo, para formar así un complejo de polímero y la o las impurezas; y
  - 10 (c) añadir un estímulo a la muestra, para así precipitar el complejo de la disolución, en donde el estímulo es un ion multivalente;

separar de esa manera la molécula objetivo de una o más impurezas.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de eliminar una cantidad residual de polímero después de la etapa (c), en donde la etapa comprende el uso de una membrana o resina modificada con un ion multivalente, preferiblemente un ion fosfato.
- 15 3. Un método para separar un anticuerpo de una o más impurezas en una muestra usando un polímero sensible a estímulos, mientras se minimizan las cantidades residuales de polímero, y el método comprende las etapas de:
  - (a) proporcionar una muestra que comprende un anticuerpo y una o más impurezas;
  - (b) poner en contacto la muestra con un polímero soluble sensible a estímulos que comprende un esqueleto de polielectrolito que comprende uno o más grupos hidrófobos unidos al esqueleto en un primer conjunto de condiciones adecuadas para que el polímero se una a una o más impurezas, formando así un primer complejo de polímero y una o más impurezas, en donde el primer conjunto de condiciones comprende ajustar el pH o la concentración de sal de la muestra durante o después de la adición del polímero;
  - 20 (c) precipitar el primer complejo de la muestra en un segundo conjunto de condiciones; o flocular el primer complejo de la muestra en un primer conjunto de condiciones y eliminar los sólidos floculados;
  - 25 (d) poner en contacto la muestra con un estímulo que comprende un ion multivalente, para formar un segundo complejo de polímero residual e ion multivalente; y
  - (e) precipitar el segundo complejo;

separar el anticuerpo de una o más impurezas en la muestra mientras se reduce la cantidad de polímero residual en la muestra.
- 30 4. El método de la reivindicación 3, en donde la o las impurezas se seleccionan del grupo que consiste en proteínas de la célula huésped, endotoxina, ADN, ARN, virus, lípidos, células enteras, agregados de anticuerpos, aditivos de cultivo celular y restos celulares.
5. El método de la reivindicación 3, en donde la muestra comprende una materia prima.
6. El método de la reivindicación 3, en el que la muestra comprende medios de cultivo celular en los que se secreta un anticuerpo.
- 35 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el polímero sensible a estímulos es un copolímero.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el estímulo es fosfato o citrato; y en donde el ion multivalente se añade durante o después de la adición del polímero a la muestra.
- 40 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el polímero sensible a estímulos se selecciona de polialilamina modificada con un grupo hidrófobo o polivinilamina modificada con un grupo hidrófobo, preferiblemente un grupo fenilo o bencilo.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el esqueleto de polielectrolito comprende al menos dos unidades monoméricas.
- 45 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el esqueleto de polielectrolito comprende al menos tres unidades monoméricas.

12. El método según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que al menos el 50% de las unidades comprenden una carga.

13. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el método comprende además una o más etapas de cromatografía o etapas de filtración.

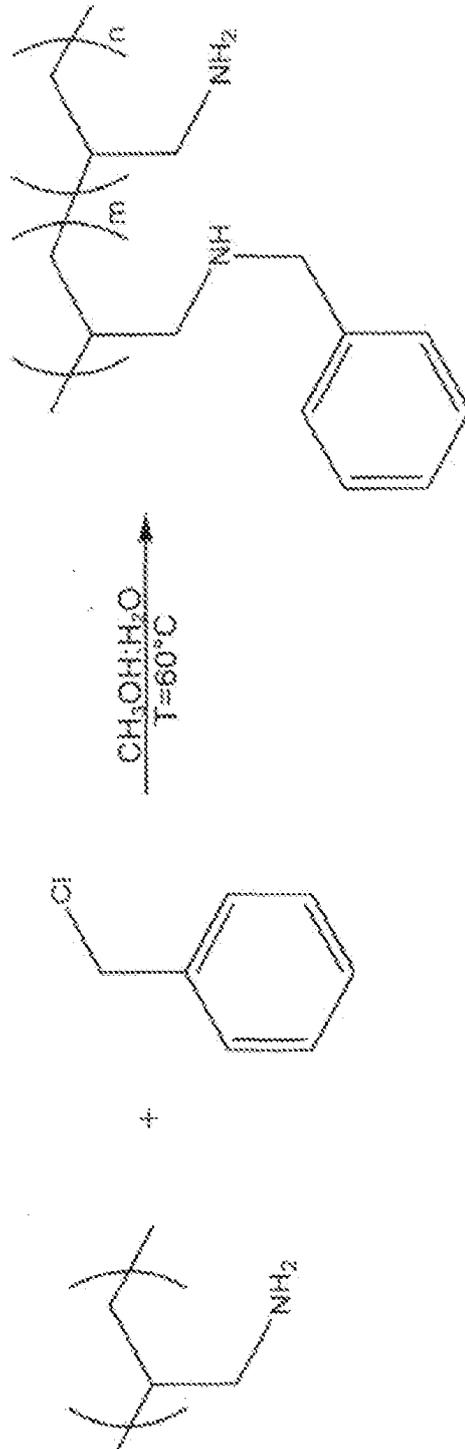


Figura 1. Reacción de polialilamina con cloruro de bencilo. Las letras "m" y "n" representan los diferentes tipos de unidades de monómero en el esqueleto de polielectrolito.

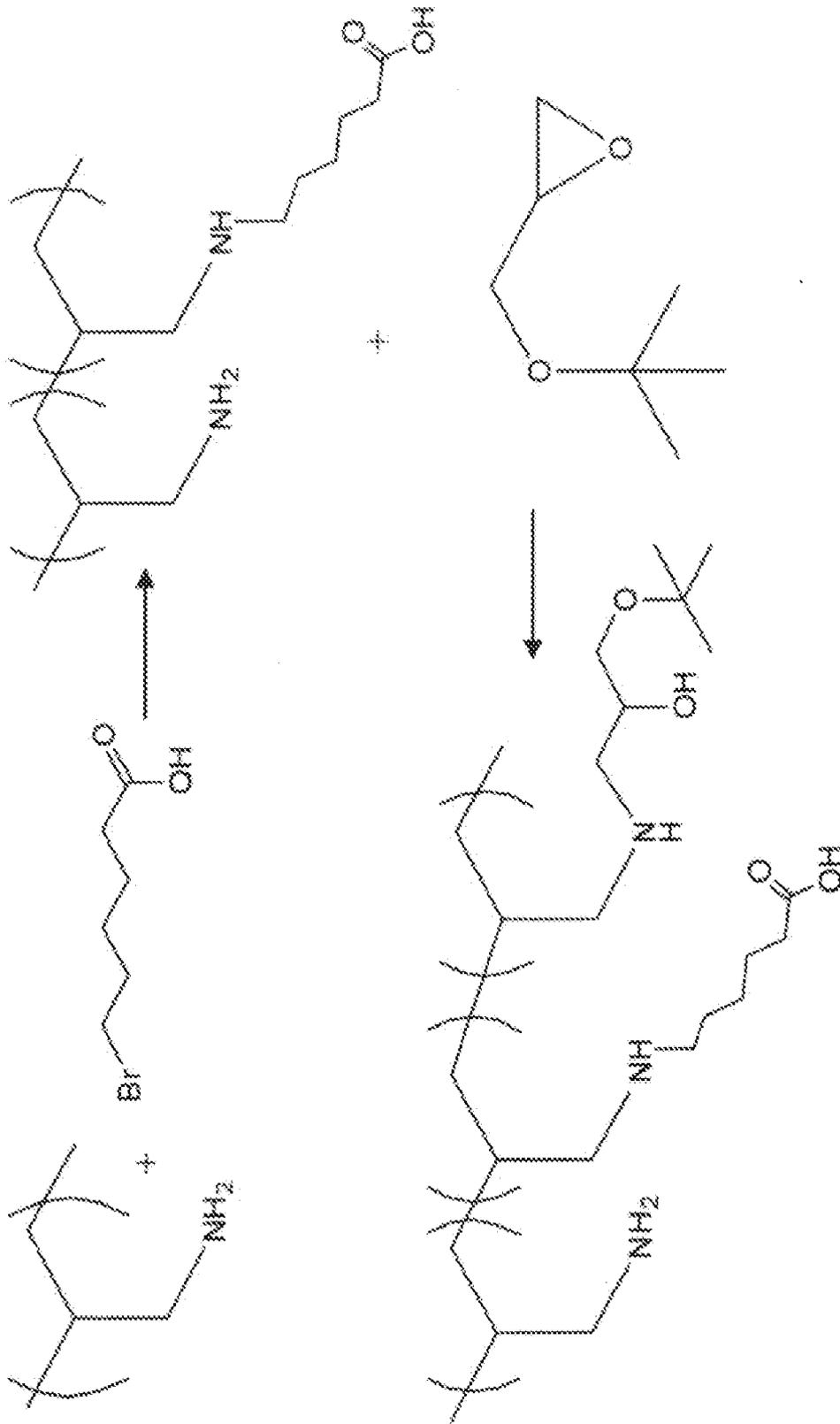


Figura 2. Esquema de reacción para el ácido hexanoico y la polialilamina modificada con terc-butilo (HC-t-BuMPAA)

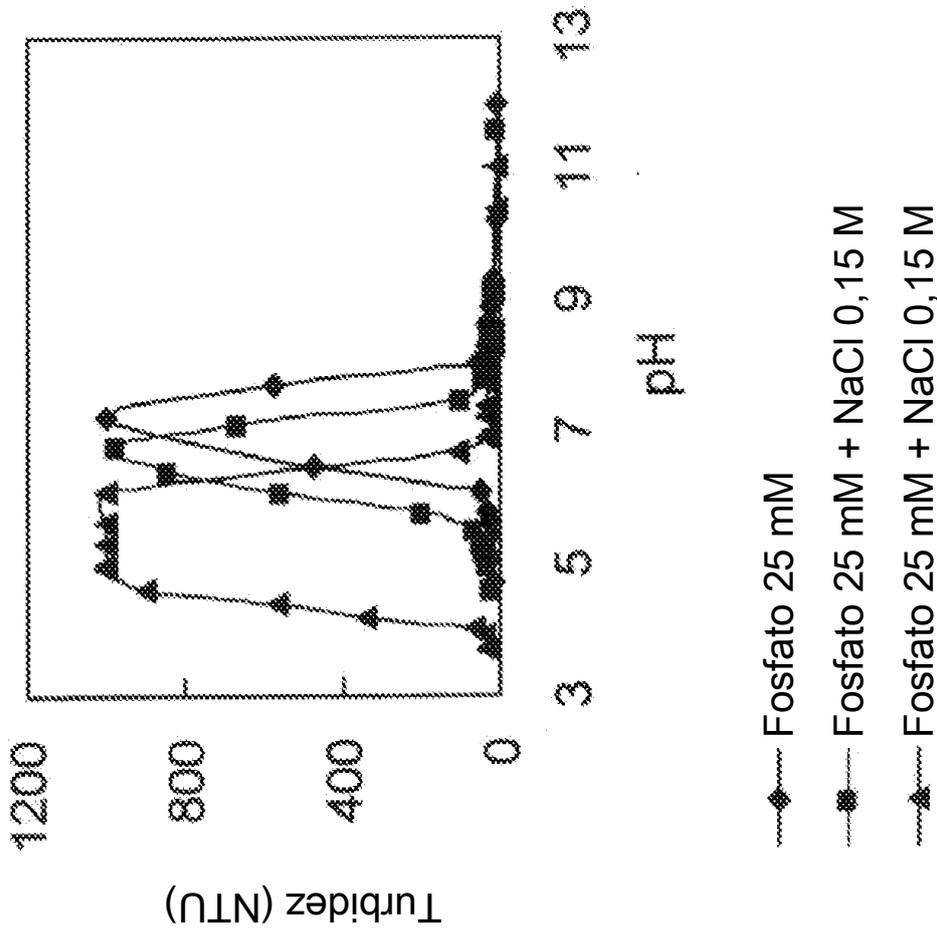
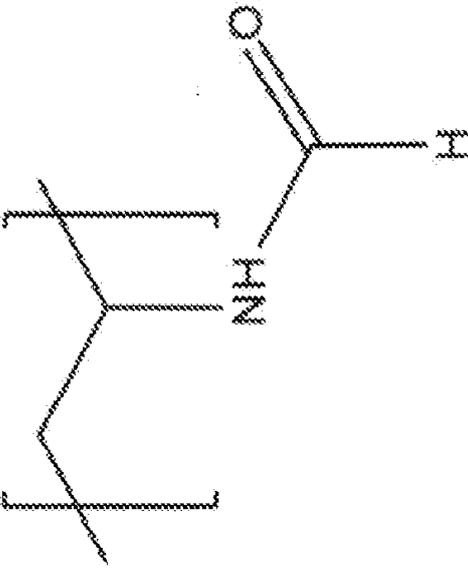
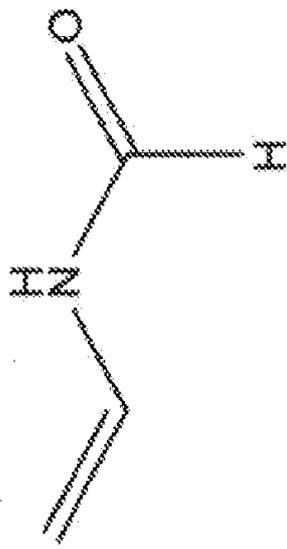


Figura 3. Efecto del cloruro de sodio sobre el estímulo multivalente de ácido hexanoico y polialilamina modificada con terc-butilo (HC-t-BuMPAA)



Polivinilformamida



N-Vinilformamida

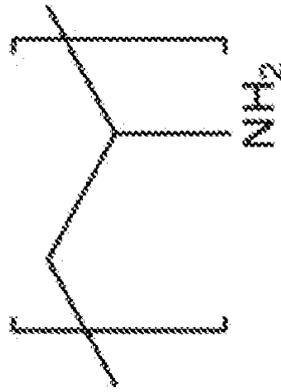
Fórmula química:  $C_3H_5NO$

Peso Molecular: 71,08

ABAP



Agua / 55-75C



Polivinilamina

NaOH / 80C



Hidrólisis

Figura 4. Síntesis de polivinilamina, como se describe en el ejemplo 29

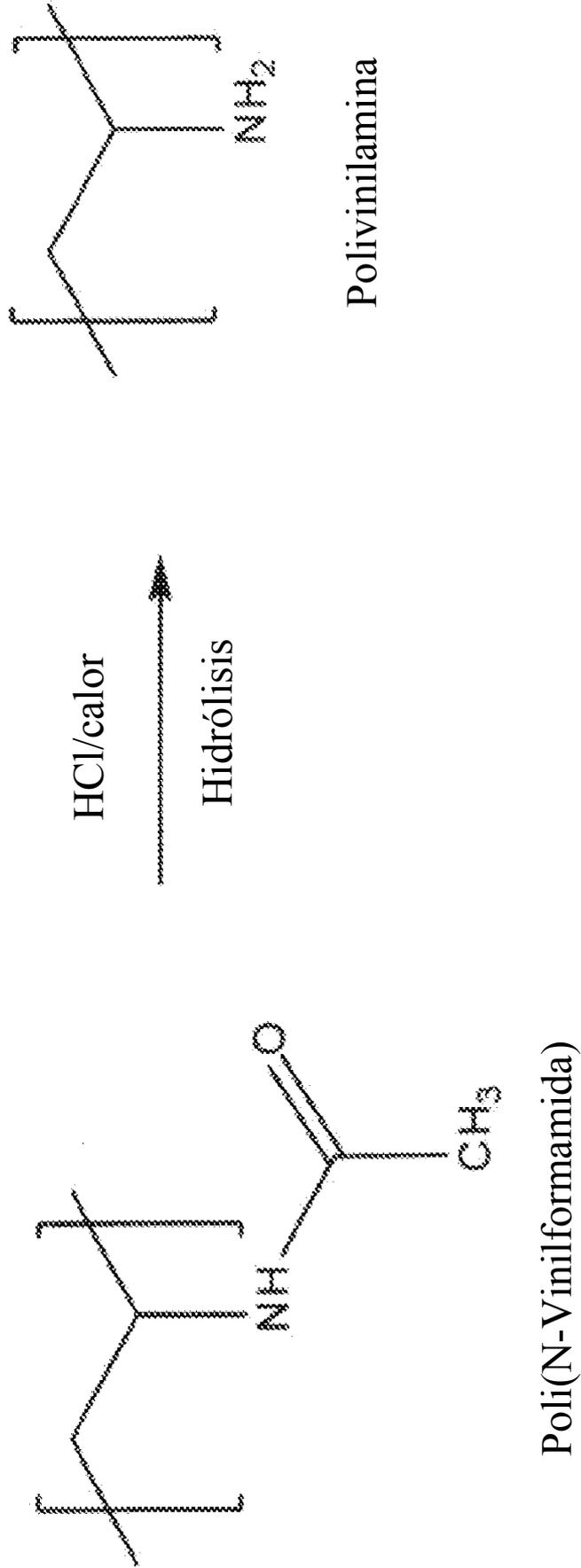


Figura 5. Desprotección de la poliamina después de la polimerización.

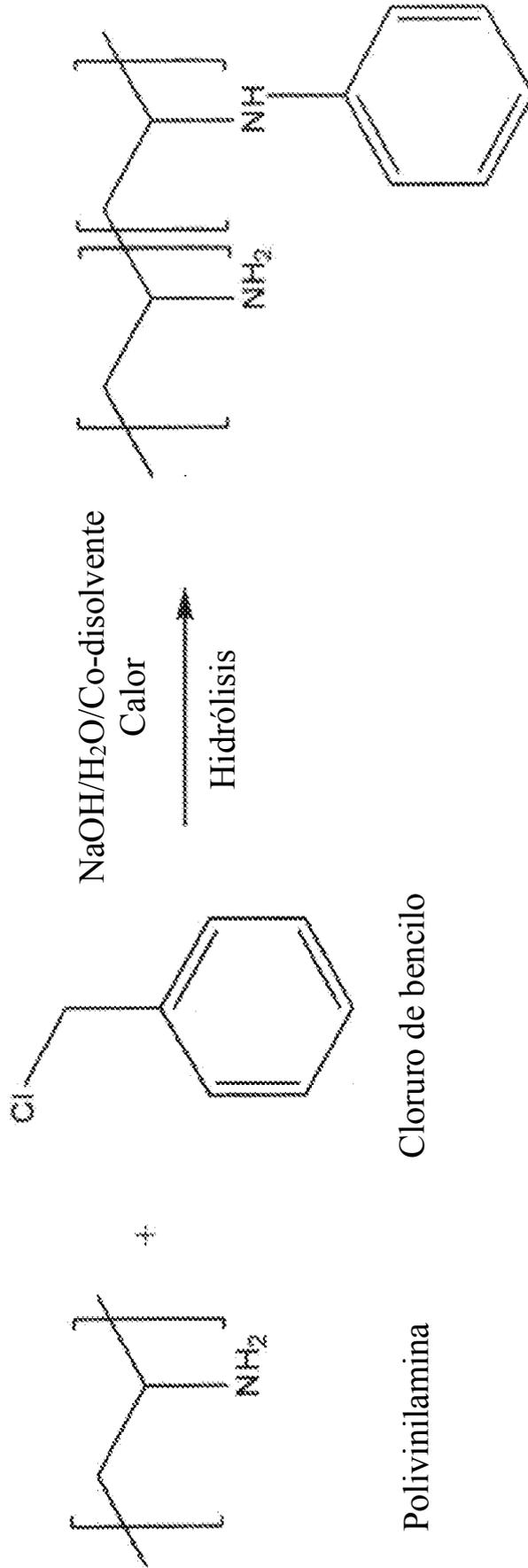
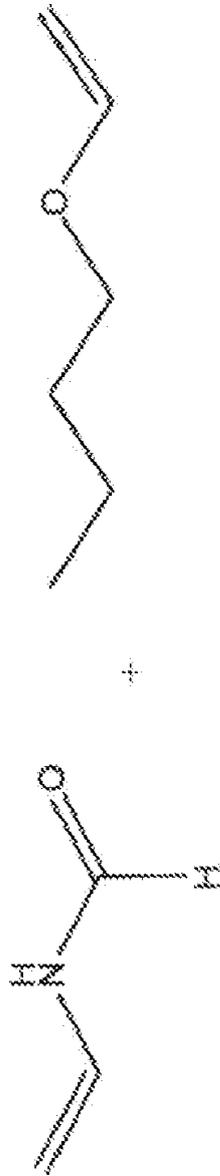
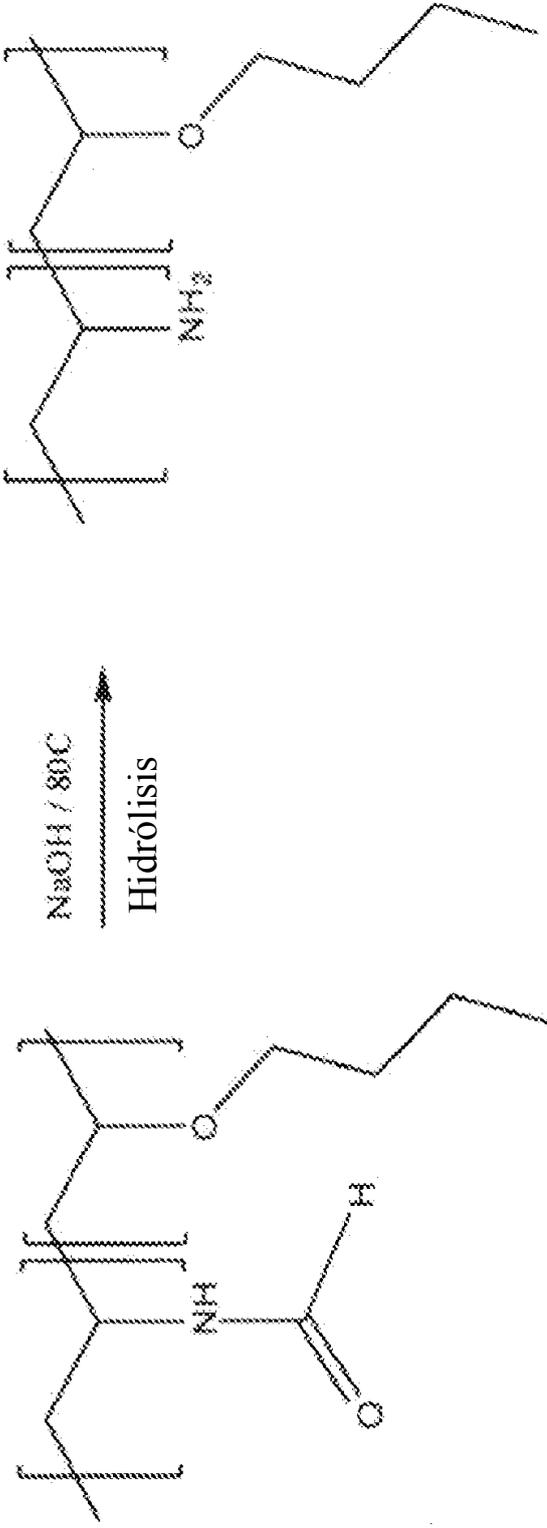


Figura 6. Reacción de polivinilamina con cloruro de bencilo.



N-vinilformamida

4-vinilbutiléter

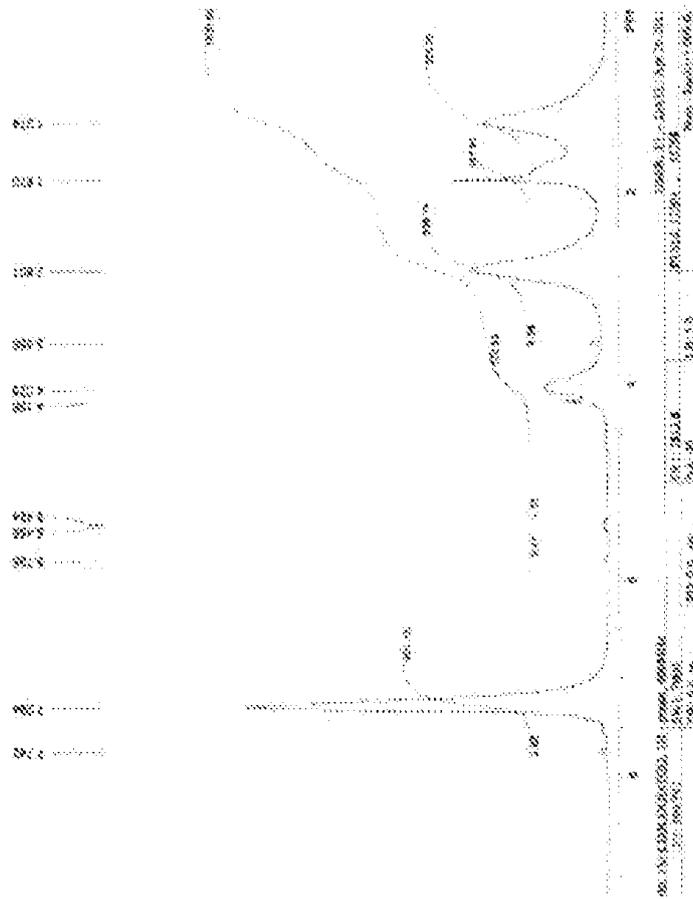


Poli(vinilformamida-co-butilviniléter)

Poli(vinilamina-co-butilviniléter)

Figura 7. Esquema de polimerización y reacción para formar un copolímero sensible a estímulos de ion multivalente.





La Figura 9 representa un espectro de RMN para la polivinilamina modificada del Ejemplo 36. La integración de la <sup>1</sup>H RMN muestra un nivel de modificación de bencilo de aproximadamente un 33%.

**Floculación del cultivo celular de CHO, efecto de la dosificación sobre la turbidez del concentrado: quitosano PMM frente a polialilamina modificada con bencilo con estímulo**

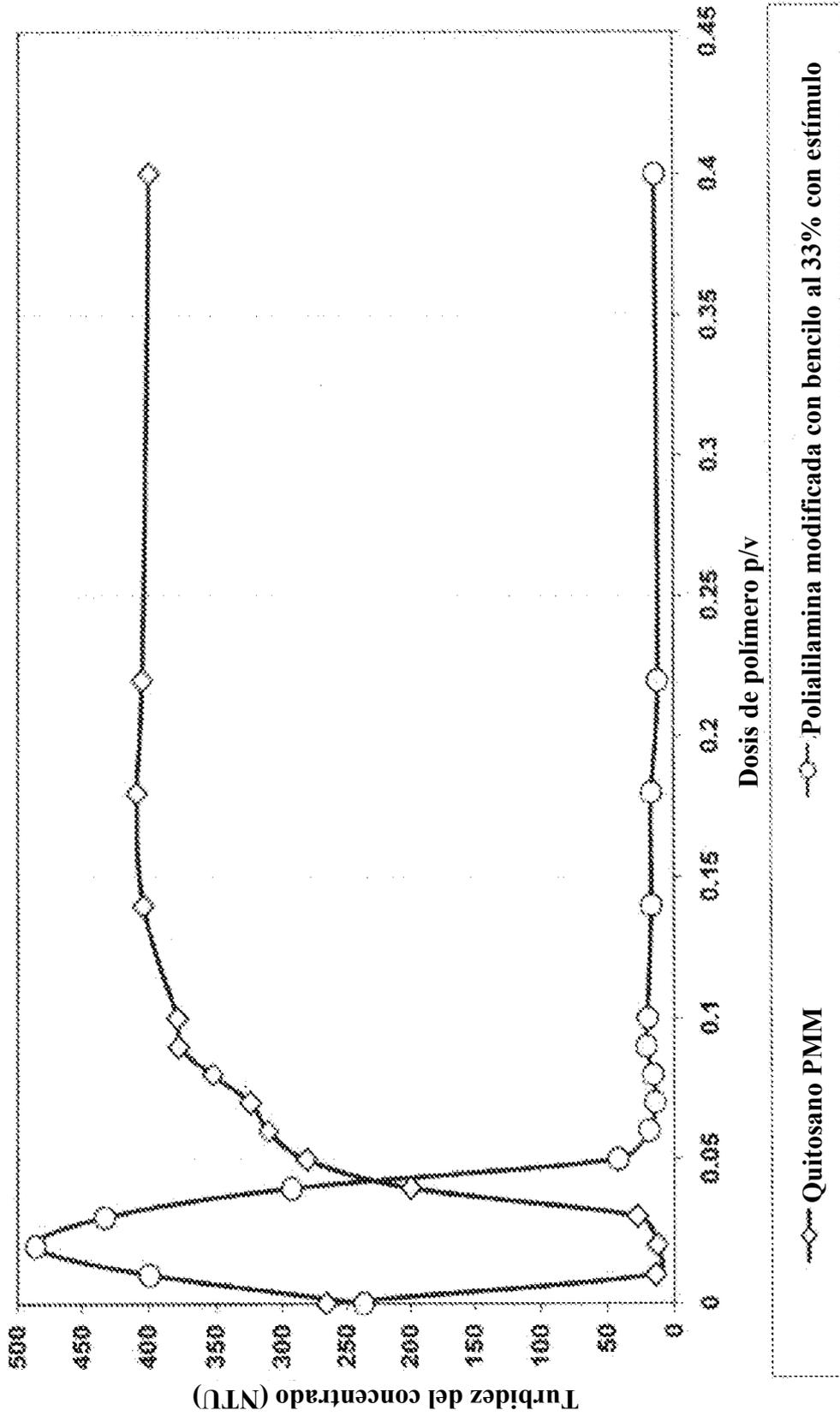


Figura 10. Turbidez del concentrado frente a la dosis de polímero para los experimentos descritos en el Ejemplo 37.

Floculación del cultivo celular de CHO, dosificación y efecto del estímulo sobre la turbidez del concentrado: polialilamina modificada con bencilo con estímulo de fosfato frente al estímulo de citrato frente a ningún estímulo

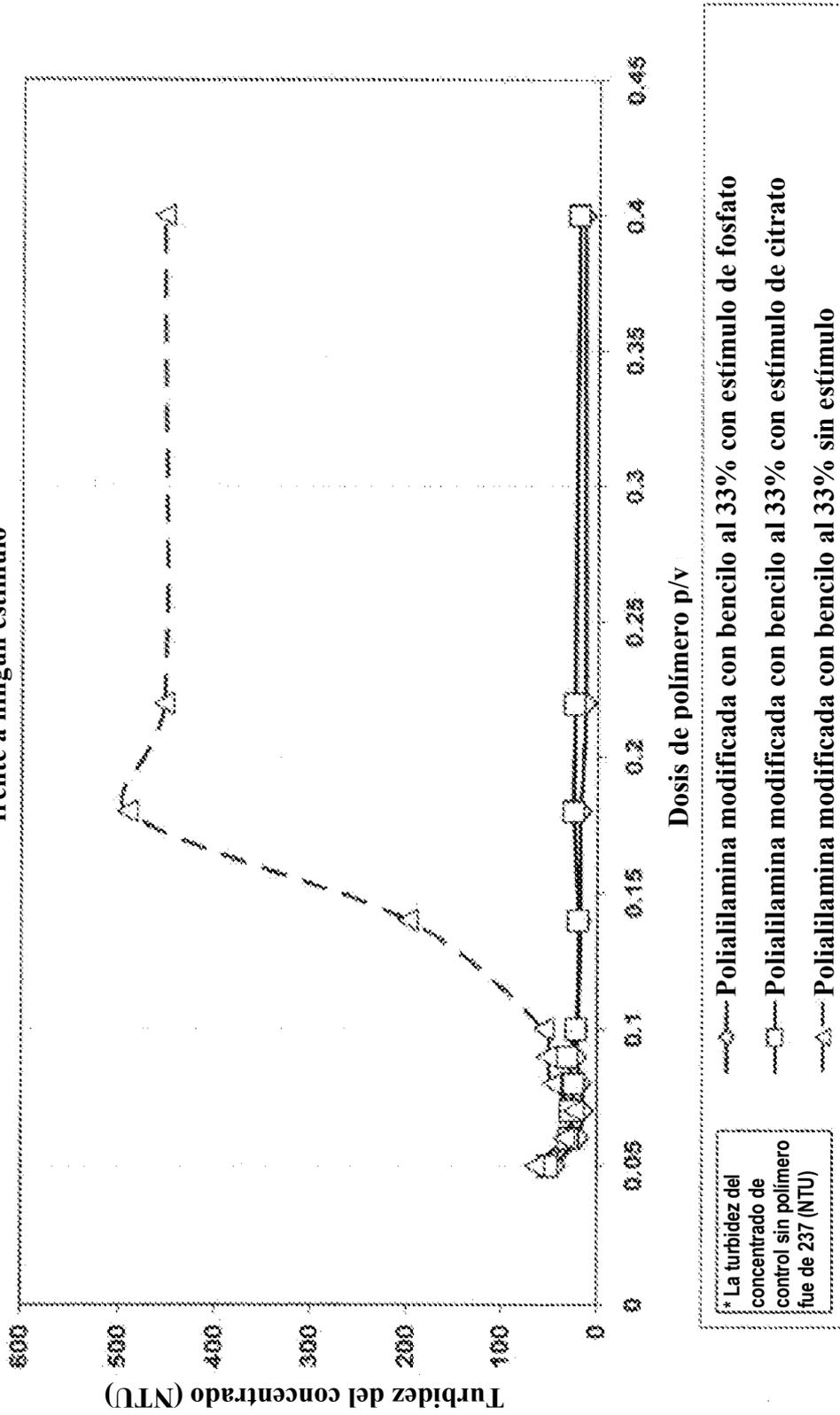


Figura 11. Turbidez del concentrado frente a la dosis de polímero para los experimentos descritos en el Ejemplo 38.

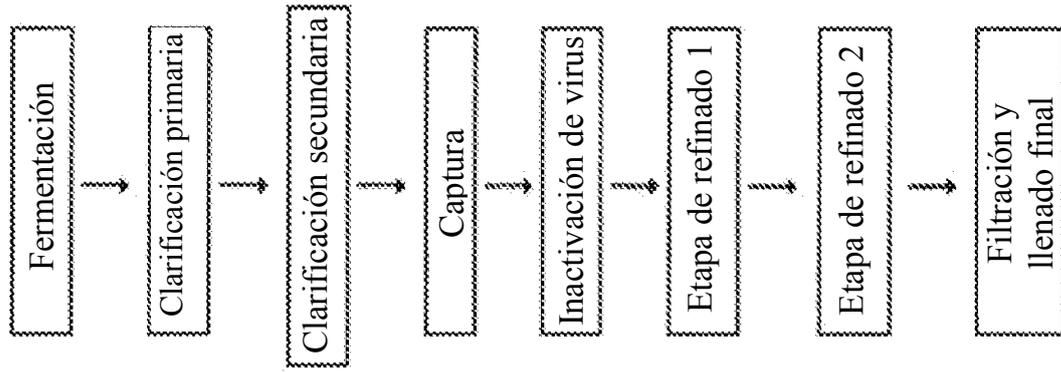


Figura 12. Un esquema típico utilizado para la purificación de biomoléculas.

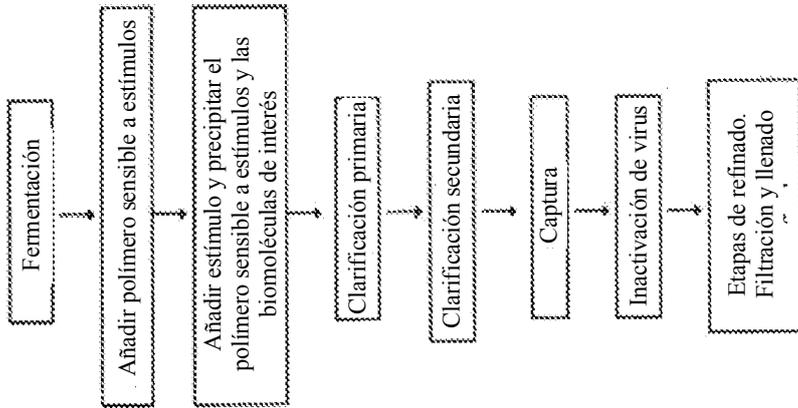


Figura 13. Esquema de purificación que incluye un polímero sensible a estímulos utilizado para mejorar la clarificación del cultivo celular. El polímero sensible a estímulos elimina una o más impurezas, sin embargo, no se une a la molécula objetivo deseada.

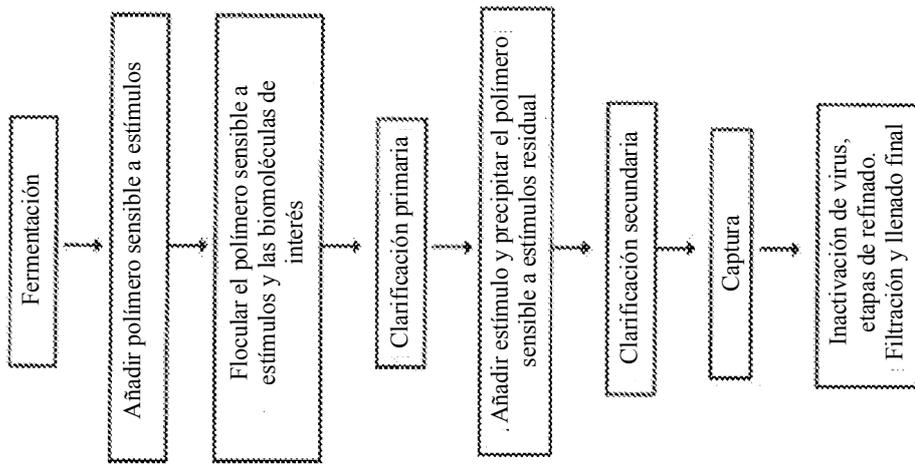


Figura 14. Esquema de purificación que incluye un polímero sensible a estímulos utilizado para mejorar la clarificación del cultivo celular. El polímero sensible a estímulos elimina una o más impurezas mediante floculación, sin embargo, no se une a la molécula objetivo deseada, y el polímero residual se elimina mediante la adición de un estímulo después de la clarificación primaria.

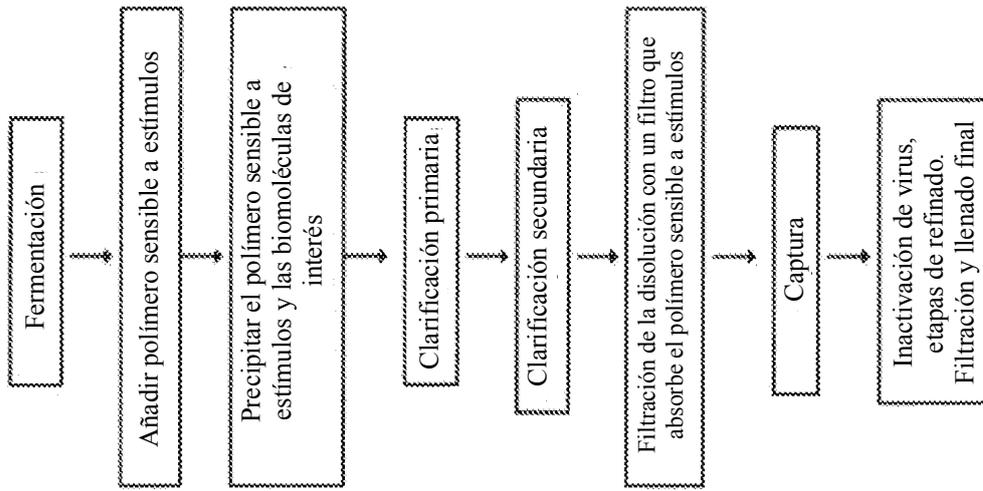


Figura 15. Esquema de purificación que incluye un polímero sensible a estímulos utilizado para mejorar la clarificación del cultivo celular. El polímero sensible a estímulos elimina una o más impurezas, pero no se une a la molécula objetivo, y el polímero residual se elimina mediante una etapa de filtración adsorbente adicional después de la clarificación.