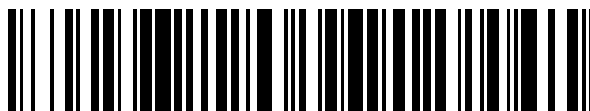


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 501**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 47/50 (2007.01)

A61K 47/64 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2014** **PCT/EP2014/061281**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014** **WO14191560**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2014** **E 14730479 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019** **EP 3003385**

54 Título: **Composición de anticuerpo y sistema amortiguador para la misma**

30 Prioridad:

31.05.2013 GB 201309759

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

25.05.2020

73 Titular/es:

INNOVA BIOSCIENCES LIMITED (100.0%)
Babraham Hall Babraham
CambridgeCambridgeshire CB2 4AT, GB

72 Inventor/es:

GEE,, NICOLAS STEVEN y
FUSETTI,, BIANCA

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 762 501 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

Composición de anticuerpo y sistema amortiguador para la misma

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición de anticuerpo para su uso en una reacción de conjugación, un kit de aislamiento de anticuerpos, un método para conjugar un anticuerpo aislado con un marcador y un sistema amortiguador para su uso en dicha composición, kit o método.

10

Antecedentes de la invención

Todos los anticuerpos se fabrican inicialmente en forma bruta (p. ej., suero inmunológico, líquido ascítico, sobrenadante de cultivo de tejido de hibridoma). Antes de su uso en muchas aplicaciones básicas de investigación y diagnóstico, los anticuerpos se deben purificar para eliminar muchas (o todas) las proteínas contaminantes que no son anticuerpos y las moléculas pequeñas (p. ej., aminoácidos).

La purificación es particularmente importante si el anticuerpo se va a unir covalentemente a una 'marca' (p. ej., una enzima, colorante orgánico, proteína fluorescente o partícula coloreada) para crear un reactivo híbrido, generalmente denominado 'anticuerpo marcado' o 'producto conjugado de anticuerpo' o con un reactivo de derivatización con el fin de introducir nuevos grupos funcionales. El componente anticuerpo de un producto conjugado confiere especificidad para un antígeno concreto (p. ej., una proteína, fármaco, péptido o biomarcador) y la marca confiere mensurabilidad para que el producto conjugado se pueda utilizar para detectar y cuantificar el antígeno, por ejemplo, en transferencias Western, secciones tejido, células cultivadas, muestras de sangre, orina, etc.

Una etapa clave en la purificación de anticuerpos es la unión del anticuerpo a una columna de afinidad de antígeno o a una columna que contenga proteína A, proteína G o proteína L inmovilizadas, que interactúan con regiones de anticuerpos que no participan directamente en la unión al antígeno. La purificación del anticuerpo en una columna de afinidad de antígeno es ventajosa ya que los anticuerpos con especificidad de antígeno irrelevante en la muestra bruta no son retenidos por la columna. Tales métodos de purificación por afinidad son robustos y fiables y se utilizan ampliamente para purificar anticuerpos de muestras brutas tales como suero, líquido de ascitis y sobrenadante de cultivo de tejido de hibridoma.

Independientemente de qué enfoque de purificación se utilice, el anticuerpo unido a la columna usualmente se eluye con un tampón de pH bajo (que típicamente comprende glicina o ácido cítrico) y a continuación se neutraliza rápidamente, por ejemplo, con tampón Tris, pH 8,0-9,0, para minimizar daño inducido por el bajo pH del anticuerpo. (p. ej., Thermo Scientific Protein Purification Technical Handbook, ref 1601617 07/08). La elución con tampones de glicina o ácido cítrico de bajo pH es popular debido a su bajo coste y debido a que tienen una buena capacidad de amortiguación a los valores de pH requeridos para la interrupción de las interacciones anticuerpo-antígeno.

Antes del almacenamiento, los anticuerpos purificados neutralizados generalmente se someten a diálisis (pero no siempre) contra PBS o algún otro tampón de pH casi neutro. A menudo, se añadirán otras sustancias (p. ej., BSA, azida de sodio, detergentes) al anticuerpo sometido a diálisis con el fin de estabilizar o prevenir el crecimiento microbiano.

Es extremadamente raro cuando se adquiere un anticuerpo de fuentes comerciales recibir información sobre las etapas de diálisis utilizadas en el procedimiento de purificación. Por lo tanto, puede no estar claro si los componentes del tampón del procedimiento de purificación permanecen en la preparación final del anticuerpo. Tales consideraciones son críticamente importantes si el anticuerpo se deba marcar, ya que los tampones utilizados para eluir las columnas de afinidad a menudo causan una interferencia severa en las reacciones de marcaje.

Muy comúnmente se anclan marcas de todos los tipos a los restos de lisina en las moléculas de anticuerpos. Por ejemplo, los ésteres de NHS de colorantes fluorescentes orgánicos y el popular derivado isotiocianato de fluoresceína (FITC) reaccionan con restos de lisina. Si bien otras químicas de conjugación (p. ej., tiol-maleimida) pueden no implicar obviamente restos de lisina, casi siempre dependen de la modificación de la lisina en una etapa anterior del procedimiento de conjugación. Por ejemplo, los reactivos de derivación de ésteres de NHS heterobifuncionales dirigidos a lisina se utilizan comúnmente para introducir maleimidas y una variedad de otros grupos funcionales (p. ej., tioles protegidos, azidas, grupos yodoacetilo) en moléculas de proteínas. Las carbodiimidas, que se utilizan para conjugar anticuerpos contra micropartículas o nanopartículas carboxiladas, implican la reacción de grupos carboxilo superficiales con restos de lisina en anticuerpos que dan como resultado la formación de enlaces amida.

Es bien sabido que las reacciones de derivatización o conjugación que implican restos de lisina no se pueden llevar a cabo en presencia de sustancias que contienen aminas primarias, tales como los aminoácidos libres. Esto se debe

a que tales sustancias competirán con los restos de lisina en la proteína. En el caso de reacciones mediadas por carbodiimida (que implica el acoplamiento de carboxilo a amina), la técnica anterior instruye firmemente contra el uso de aditivos con funcionalidad carboxilo o amina primaria debido a problemas de competición.

5 Por lo tanto, los tampones de elución de anticuerpos populares están contraindicados en casi todos los tipos de métodos de marcaje de anticuerpos. Ni la glicina ni el ácido cítrico pueden estar presentes en las reacciones mediadas por carbodiimida entre un anticuerpo y un marcador ya que la reacción implica la condensación de una amina y un grupo carboxilo.

10 Por ejemplo, en Bioconjugate Techniques, Hermanson GT, 1995, ISBN 0-12-342336-8, pág. 102 (y pág. 117 en la 2ª edición actualizada, 2008 ISBN 9780123705013) se proporcionan los siguientes consejos: "Evitar los tampones que contengan carboxilato o amina, tales como citrato, acetato, glicina o Tris".

15 Bangs Labs, nota técnica 205 con referencia a los estados de acoplamiento de carbodiimida "Se deben evitar los tampones que contengan aminas libres, tales como Tris o Glicina".

20 Las reacciones que utilizan microesferas que contienen carboxilo se comentan en 'Immobilization of Enzymes and Cells', 2006, ed. Guisan JM, pág. 223, ISBN 1-58829-290-8) y presenta la siguiente nota de advertencia: "Se deben evitar tampones que contengan aminas libres, tales como Tris de [sic] glicina".

Un kit de biotilación dependiente de carbodiimida (EZ-Link® Amine-PEGn-Biotin, código de producto 26136) de ThermoFisher dice: "Evitar los tampones que contengan aminas primarias (Tris, glicina, etc.) o carboxilos (acetato, citrato, etc.) ya que extinguirán la reacción".

25 El procedimiento de G Biosciences para su resina de acoplamiento de carboxilo advierte: "NOTA: Para las reacciones de acoplamiento que utilizan EDC, evitar el uso de tampones que contengan aminas o fosfatos libres, ya que estos interferirán con la eficacia del acoplamiento. Los tampones de Tris, acetato y glicina reaccionan fácilmente con EDC o el intermedio de acoplamiento".

30 Finalmente, un protocolo para su uso con un kit de conjugación de oro carboxilado establece: Cualquier otra molécula que contenga amina o carboxilo en la solución de proteína (incluidos los estabilizadores de proteína) competirá con la reacción de conjugación "(OceanNanotech, código de producto GCK).

35 En el caso de reacciones de modificación dirigidas a lisina que no implican también la modificación de carboxilo, se puede tolerar el ácido cítrico, pero la glicina siempre está contraindicada, p. ej. el protocolo de Colorantes con Aminas Reactivas DyLight® (Thermo Scientific, Núm. 2032.11) establece: "Los tampones que contienen aminas primarias (p. ej., Tris o glicina) interferirán ya que reaccionan con el radical éster de NHS".

40 Las moléculas pequeñas potencialmente interferentes, tales como la glicina y el ácido cítrico, en una muestra de anticuerpo se pueden eliminar mediante diálisis o desalación antes de que el anticuerpo se utilice en reacciones de conjugación. La eficacia de la eliminación de tales moléculas por diálisis está relacionada con el volumen de la muestra de anticuerpos con respecto a la del tampón de diálisis, el número de cambios del tampón de diálisis y si se alcanza el equilibrio antes del siguiente cambio de tampón. Tal información casi nunca se conoce para anticuerpos comerciales.

45 Desafortunadamente, es difícil someter a diálisis/desalar anticuerpos comerciales sin pérdidas significativas de material, ya que el anticuerpo generalmente se adquiere en pequeñas cantidades (p. ej., 100 µl a una concentración de alrededor de 1 mg de anticuerpo/ml). Además, se puede producir la dilución de la muestra durante la diálisis, lo que tal vez requiera etapas posteriores de concentración de anticuerpos (lo que da como resultado pérdidas adicionales de material) para lograr la concentración mínima requerida (típicamente 1 mg/ml) para su uso en reacciones de marcaje de anticuerpos. La diálisis de cantidades en miligramos de anticuerpo es relativamente fácil, pero el procedimiento es necesariamente lento y puede durar 1-2 días si se requieren varios cambios de tampón. Las membranas de diálisis y los grandes volúmenes de tampón de diálisis que se requieren a grandes escalas de miligramos también aumentan el coste de producción.

50 Una purificación de una sola etapa con un fragmento de anticuerpo F_v expresado bacterianamente mediante cromatografía de afinidad con metal inmovilizado en presencia de betaína se describe en Journal of Chromatography A, 657 (1993) 55-61. Se utiliza un gradiente de imidazol para eluir la proteína en presencia de betaína 0,5 M. La elución eficaz de anticuerpos por arginina y derivados de arginina en cromatografía en columna de afinidad se describe en Analytical Biochemistry 345 (2005) 250-257. Se utilizaron altas concentraciones iónicas de arginina para eluir los anticuerpos de las columnas de proteína A.

La presente invención tiene como objetivo proporcionar métodos para purificar y/o conjugar anticuerpos, kits para tales métodos y composiciones de anticuerpos que superan los inconvenientes de la técnica anterior.

Compendio de la invención

Las tecnologías de marcaje de anticuerpos han avanzado significativamente en los últimos años, particularmente con respecto a la simplificación de procedimientos. Los métodos de conjugación de múltiples etapas están siendo reemplazados por procedimientos simples de una sola etapa que no requieren por parte del operador ningún conocimiento particular de química.

Se requiere una mejor integración de los procedimientos de purificación de anticuerpos y las reacciones de marcaje para evitar las etapas intermedias de diálisis, que son lentas, aumentan los costes y provocan pérdidas de anticuerpos. Existe una clara necesidad de un "tampón de elución favorable a la conjugación" (CFEB), ya que los tampones adoptados originalmente por los científicos de purificación de anticuerpos son incompatibles con la mayoría de las químicas de conjugación. Los autores de la presente invención definen aquí un CFEB como un tampón con un pKa entre 1 y 4 que no causa interferencia en los métodos de conjugación populares (es decir, mínimamente, reacciones de anticuerpos con carbodiimidas, ésteres de NHS, isotiocianatos, maleimidas y reactivos de tiolación).

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición de anticuerpo para su uso en una reacción de conjugación. La composición comprende un anticuerpo aislado en un sistema amortiguador en el que el sistema amortiguador comprende un compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico, que porta un sustituyente amonio cuaternario en la posición alfa o beta, en donde el compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico está presente a una concentración de menos de 200 mM.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un tampón que comprende un compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico que porta un sustituyente amínico en la posición alfa o beta para eluir un anticuerpo de una fase sólida, en el que el pH del tampón está en el intervalo de 1,8 a 3,5, en donde el sustituyente amínico del ácido monocarboxílico es un amonio cuaternario.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit de aislamiento de anticuerpos que comprende una matriz de afinidad en fase sólida para unir un anticuerpo y un tampón para eluir el anticuerpo cuando se une a la matriz de afinidad, en donde el tampón comprende un compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico distinto de glicina, que porta un sustituyente amínico en la posición alfa o beta, en donde el pH del tampón está en el intervalo de 1,8 a 3,5, y en donde el sustituyente amínico del ácido monocarboxílico es un amonio cuaternario.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para conjugar un anticuerpo aislado con un marcador. El método comprende poner en contacto el anticuerpo con la marca activada, o la marca en presencia de un reactivo de conjugación de anticuerpos, en un sistema amortiguador que comprende un compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico distinto de glicina, que tiene un sustituyente amínico en la posición alfa o beta.

Sorprendentemente, se ha encontrado que un sistema amortiguador que comprende un compuesto ácido monocarboxílico que porta un sustituyente amínico en la posición alfa o beta se puede utilizar en una reacción de conjugación de anticuerpos. Tal sistema amortiguador se puede utilizar tanto en procedimientos de purificación de anticuerpos como en reacciones de conjugación, evitando así la necesidad de etapas de diálisis que no son deseables.

Para determinar el grado de interferencia en las reacciones de las moléculas de carbodiimida que probablemente se encuentren en los anticuerpos comerciales (p. ej., glicina, ácido cítrico, azida), los autores de la presente invención estudiaron las reacciones entre un anticuerpo y una nanopartícula carboxilada disponible en el mercado. Resultó sorprendente descubrir que la glicina no causaba interferencia, incluso a altas concentraciones. La glicina tiene funciones tanto de amina como de carboxilo y está claramente contraindicada en la técnica anterior. Los autores de la presente invención aprovecharon este hallazgo inesperado para desarrollar un nuevo kit de purificación, cuyo anticuerpo producto se puede utilizar no solo en reacciones de carbodiimida, sino también con todas las demás químicas de conjugación populares sin la necesidad de una etapa de diálisis de anticuerpos pre-conjugación. La invención se describe más completamente a continuación.

El compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico porta un sustituyente amínico en la posición alfa o beta y puede comprender además uno o más sustituyentes adicionales, siempre que no sean capaces de interferir con la reacción de conjugación. Típicamente, si está presente, los sustituyentes adicionales son uno o más sustituyentes no amínicos. Se prefiere que no haya más sustituyentes presentes en el compuesto amortiguador.

Las aminas secundarias o terciarias se prefieren como sustituyentes amínicos típicamente porque son menos reactivas que las aminas primarias en la reacción de conjugación. El sustituyente amínico es preferiblemente un sustituyente de amonio cuaternario. Una clase preferida de compuestos particularmente adecuados como compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico son las betaínas. Las betaínas contienen el sustituyente de amonio cuaternario. Una betaína preferida es N,N,N-trimetilglicina, que también se conoce como glicina betaína.

Sin embargo, el sustituyente amínico del compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico puede ser una amina primaria. Cuando el ácido monocarboxílico es un aminoácido primario, puede ser alanina, beta-alanina o ácido 2-aminobutírico. Las aminas secundarias o terciarias típicas incluyen prolina, tricina, N-metilglicina, N,N-dimetilglicina o ácido 2-picolínico.

La presencia del sustituyente amínico en el compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico rebaja el pKa del grupo carboxilo al estabilizar el anión carboxilato a través de un efecto captador de electrones. Típicamente, el grupo carboxilo del compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico tiene un pKa en el intervalo de 1 a 4, preferiblemente en el intervalo de 1,5 a 3,5. La amina del compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico tiene un pKa típicamente mayor que 8, preferiblemente mayor que 9. En una reacción de conjugación a pH 5, la amina está en gran parte en forma protonada, por lo que no reacciona en la reacción de conjugación.

El compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico está presente en la composición de anticuerpo a una concentración de menos de 200 mM, preferiblemente menos de 100 mM, más preferiblemente menos de 50 mM.

En una disposición, el sistema amortiguador comprende adicionalmente un compuesto amortiguador de neutralización que tiene un pKa mayor de 5,5. El compuesto amortiguador neutralizante puede estar presente en el sistema amortiguador como resultado de cómo se ha aislado el anticuerpo. Esto se describe con más detalle a continuación. El pH de la composición de anticuerpo está típicamente en el intervalo de 5 a 9. El tampón neutralizante está presente preferiblemente para aumentar el pH de la composición después de la elución de una fase sólida a pH más bajo. La exposición prolongada a pH bajo no es deseable para las composiciones de anticuerpos porque puede inducir daño en la proteína anticuerpo.

El sistema amortiguador puede comprender además un compuesto amortiguador de captura con un pKa en el intervalo de 6 a 8. En esta disposición, el compuesto amortiguador neutralizante preferiblemente tiene un pKa superior a 8 y está más preferiblemente en el intervalo de 8 a 11. La concentración del compuesto amortiguador de captura es preferiblemente menor que la concentración del compuesto amortiguador neutralizante. El tampón de captura se describe con más detalle a continuación.

En una disposición, el anticuerpo aislado se conjuga con una marca. La marca puede comprender una enzima, una proteína fluorescente, un colorante orgánico, una partícula coloreada, biotina, estreptavidina o un polímero.

En una disposición, el sistema amortiguador se utiliza como medio de almacenamiento para un anticuerpo o producto conjugado de anticuerpo. De esta manera, las composiciones de anticuerpos se pueden almacenar listas para su uso sin la necesidad de una etapa de diálisis antes de su uso.

Cuando el sistema amortiguador que comprende el compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico se utiliza para eluir un anticuerpo de una fase sólida, la fase sólida se puede disponer en una columna. Típicamente, la fase sólida comprende una matriz de afinidad para el anticuerpo. El pH del tampón para eluir el anticuerpo está en el intervalo de 1,8 a 3,5. Se necesitan pH ácidos de este tipo para eliminar el anticuerpo cuando se une específicamente a la fase sólida.

El tampón de neutralización se puede utilizar en el aislamiento del anticuerpo para evitar el daño inducido por el pH del tampón de elución relativamente ácido. El tampón de neutralización puede comprender un compuesto de morfolina, piperizina o N-ciclohexilo. Preferiblemente, el tampón de neutralización comprende ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 3-morfolino-2-hidroxiopropanosulfónico (MOPSO), (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico) (HEPES), ácido 3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]propanosulfónico (EPPS o HEPPS), piperazin-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(ácido 2-hidroxiopropanosulfónico) (HEPPSO); N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(ácido 4-butanosulfónico) (HEPBS), ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico (CHES), ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico (CAPS), ácido 4-(ciclohexilamino)-1-butanosulfónico (CABS) o ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxil-1-propanosulfónico (CAPSO).

El pH del tampón de neutralización es preferiblemente superior a 6. Por lo tanto, la introducción del tampón de neutralización en cantidad suficiente en una composición que comprende anticuerpo eluido a pH ácido aumentará el pH a un nivel en el que el anticuerpo es relativamente estable.

En algunas disposiciones, el pH del tampón de neutralización está por encima de 8 y lo más preferiblemente en el intervalo de 8,5 a 11, tal como de 9 a 9,5. El tampón de neutralización generalmente tiene un pKa dentro de una unidad del valor de pH. Cuando el tampón de neutralización está por encima de 8, se prefiere utilizar adicionalmente un tampón de captura con un pKa en el intervalo de 6 a 8. El propósito del tampón de captura es evitar el uso del tampón de neutralización que hace que el pH de la composición que comprende el anticuerpo eluido aumente demasiado. Los compuestos amortiguadores adecuados para su uso como el tampón de captura incluyen MOPS o HEPES. El tampón de captura se puede añadir como una solución con un pH típicamente en el intervalo de 6 a 8.

Alternativamente, el tampón de captura se puede combinar con el tampón de neutralización. En esta situación, el pH de la solución combinada típicamente está muy por encima del pKa del tampón de captura, y típicamente es mayor que pH 8.

El método para conjugar el anticuerpo aislado con la marca o el reactivo de derivatización comprende poner en contacto el anticuerpo con la marca activada o el reactivo de derivatización activado, o poner en contacto el anticuerpo con la marca o reactivo de derivatización en presencia de un reactivo de conjugación de anticuerpos en el sistema amortiguador. El reactivo de conjugación de anticuerpos, la marca activada o el reactivo de derivatización activado típicamente comprenden uno o más de los siguientes grupos reactivos: una carbodiimida, un éster de N-hidroxisuccinimida, una maleimida, un isotiocianato o un reactivo de tiolación. El método para conjugar el anticuerpo aislado con la marca se lleva a cabo típicamente a un pH en el intervalo de 5 a 9. Ventajosamente, antes de la etapa de poner en contacto el anticuerpo con la marca, el anticuerpo se aísla mediante una etapa de elución del anticuerpo de la fase sólida como se describe en la presente memoria. Según la presente invención, un sistema amortiguador para conjugar el anticuerpo aislado con la marca comprende el tampón utilizado para la etapa de elución del anticuerpo. De esta manera, no hay necesidad de ninguna etapa de intercambio de tampón, tal como la etapa de diálisis.

Descripción detallada

La invención se describirá ahora con más detalle, solo a modo de ejemplo, con referencia a los siguientes Ejemplos y las Figuras adjuntas, en los que:

- La Figura 1 muestra el efecto de la betaína en una reacción de conjugación de fluoresceína;
- La Figura 2 muestra el efecto de la tricina en una reacción de conjugación de ficoeritrina;
- La Figura 3 muestra el efecto de betaína, ácido cítrico y glicina en una reacción de conjugación de isotiocianato (fluoresceína);
- La Figura 4 muestra el efecto de la betaína, el ácido cítrico y la glicina en una reacción de conjugación de éster (fluoresceína) de NHS;
- La Figura 5 muestra el efecto de la betaína, el ácido cítrico y la glicina sobre la estabilidad del iminotiolano; y
- La Figura 6 muestra la neutralización de CFEB con un componente de pKa alto en presencia y ausencia de un tampón de captura.

En experimentos para determinar el grado de interferencia en las reacciones de conjugación de diversas sustancias que se encuentran comúnmente en los anticuerpos comerciales, los autores de la presente invención descubrieron que las altas concentraciones de glicina, al contrario de una gran cantidad de evidencia en la técnica anterior, no interfieren en una reacción mediada por carbodiimida entre un anticuerpo y una nanopartícula de oro carboxilada.

Las concentraciones de las diversas especies en las reacciones fueron típicamente: anticuerpo, 16,67 nM; lisinas de anticuerpos, 1 μ M (suponiendo 60 lisinas por molécula de anticuerpo); EDC, 0,1 mM; y glicina, 50 mM. Por lo tanto, hay un gran exceso molar de glicina sobre las lisinas de anticuerpos y EDC y, sin embargo, los grupos ácido y amina de la glicina no evitan una reacción de conjugación productiva entre los restos de lisina en el anticuerpo y los grupos carboxilo en la nanopartícula de oro. Se encontró que la EDC era obligatoria en esta reacción; no se formó producto conjugado en ausencia de la carbodiimida.

La reactividad química de un grupo funcional a menudo está relacionada con su pKa* y con el pH de la mezcla de reacción. [*los valores de pKa proporcionados a continuación son para una temperatura de 25°C].

El pKa del grupo carboxilo en la glicina (2,35) es relativamente bajo en comparación con otros ácidos alifáticos comparables (p. ej., ácido acético, pKa 4,76) como resultado del efecto estabilizador (captación de electrones) del grupo alfa-amino. Los cálculos que utilizan la ecuación de Henderson-Hasselbach muestran que el grupo amina de la glicina (pKa 9,8) está casi totalmente en su forma protonada no reactiva a pH 5,0, lo que puede explicar en parte por qué el grupo amino de la glicina se puede tolerar en las reacciones de carbodiimida.

Sin embargo, la primera etapa en una reacción mediada por carbodiimida implica la reacción de EDC con un grupo carboxilo, que según la teoría está ionizado en 99,78% (es decir, COO⁻) en la glicina a pH 5. Como esta es la forma que ataca a las carbodiimidas protonadas en solución acuosa, las consideraciones de pKa claramente no pueden explicar la falta de interferencia de la glicina. Más bien, se esperaría que el grupo carboxilo ionizado consumiera EDC, a través de ciclos de activación de carboxilo y a continuación hidrólisis rápida o reacción con cualquier amina disponible, y por lo tanto interfiriera en la reacción del anticuerpo con las nanopartículas carboxiladas.

En vista de las afirmaciones erróneas en la técnica anterior sobre los efectos de la glicina en las reacciones de conjugación de anticuerpos y nanopartículas mediadas por carbodiimida, los autores de la presente invención se preguntan si podrían haberse pasado por alto otras sustancias que contienen amina y carboxilo como posibles sustancias favorables a la conjugación. Más importante aún, los autores de la presente invención esperaban

identificar sustancias compatibles con múltiples tecnologías de conjugación de anticuerpos, no solo aquellas compatibles con reacciones mediadas por carbodiimida.

Centraron sus pruebas en ácidos orgánicos con valores de pKa de alrededor de 1-4, que pueden ser adecuados para su uso como tampones para la elución de columnas de afinidad de anticuerpos. También ampliaron su estudio para incluir otros aditivos de anticuerpos comunes y una variedad de ácidos, aminoácidos y otros derivados para tratar de comprender el mecanismo que sustentaba la falta de interferencia de la glicina en las reacciones de carbodiimida.

Las moléculas se probaron inicialmente a pH 5 en reacciones mediadas por EDC con partículas de oro carboxiladas (InnovaCoat GOLD, Innova Biosciences). Las moléculas potencialmente interesantes de este ejercicio de detección se evaluaron adicionalmente en reacciones de éster del NHS, reacciones de isotiocianato y reacciones de tiolación que implican iminotiolano. Todas estas reacciones se utilizan ampliamente en el campo de conjugación de anticuerpos y se esperaba que todas sufrieran interferencia en presencia de glicina.

Los resultados en el escrutinio con una reacción mediada por carbodiimida se muestran en la Tabla 1.

El fosfato y la azida de sodio, aditivos comunes en los anticuerpos, causaron interferencia probablemente al reaccionar directamente con EDC. Tris, un tampón de neutralización primario común que contiene amina o un tampón de almacenamiento causó graves interferencias.

Se identificaron varios aminoácidos y moléculas relacionadas que muestran poco o ningún efecto, incluyendo alanina, ácido DL-2-aminobutírico, betaína (glicina betaína; *N,N,N*-trimetilglicina), *N,N*-dimetilglicina, beta-alanina, *N*-metilglicina (sarcosina), ácido 2-picolínico (ácido 2-piridincarboxílico), tricina [*N*-tris(hidroximetil)metilglicina] y prolina.

Otros aminoácidos mostraron una interferencia significativa, incluyendo GABA (ácido gamma-amino butírico) y ácido nicotínico.

Los monoaminoácidos con dos grupos ácidos (p. ej., aspartato) causaron interferencias graves (datos no mostrados).

Otros ácidos (es decir, los que carecen de aminas) que causaron interferencias severas incluyeron ácido cítrico, ácido succínico, ácido tricloroacético y ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico.

Los ácidos que causaron interferencia significativa pero que no abolieron totalmente la reacción de conjugación incluyeron ácido ciclohexanocarboxílico, acetato de sodio y ácido pivalico.

Tomados en conjunto, estos datos iluminan las características estructurales que se deben diseñar en un tampón CFEB para minimizar la interferencia en las reacciones de carbodiimida.

Todas las moléculas con una función ácida y que carecen de átomos de nitrógeno (es decir, carecen de amina primaria, secundaria o terciaria; o carecen de un ion de amonio cuaternizado) causaron interferencia. Las moléculas con dos funcionalidades ácidas causaron interferencia independientemente de si también estaba presente una amina. Por lo tanto, la presencia tanto de un grupo amina como de un grupo carboxilo, cualquiera de los cuales se espera que esté contraindicado en reacciones de carbodiimida, en algunos casos, juntos pueden prevenir la interferencia.

Está claro que la posición de la amina con respecto al grupo ácido (típicamente carboxilo) es muy importante. Para los compuestos que muestran la menor interferencia, las funcionalidades amina y carboxilo están separadas por un átomo. Algunas moléculas con dos átomos intermedios fueron razonablemente bien toleradas, pero con tres átomos intermedios los compuestos causan interferencia significativa.

En el GABA, las funcionalidades amino y carboxilo están separadas por tres átomos y la amina no rebaja el pKa del ácido (pKa 4,23). La mayoría de los grupos ácidos (85,5%) están en la presunta forma reactiva de COO a pH 5, en comparación con una cantidad aún mayor en la forma reactiva (~99,8%) para la glicina. Sin embargo, el GABA inhibe significativamente la reacción mediada por carbodiimida, mientras que la glicina (pKa 2,3) no. El ácido amino butírico DL-2 (pKa 2,29), que es un isómero de GABA con las funcionalidades amínicas y carboxílicas en estrecha proximidad (es decir, separación de 1 átomo) no mostró interferencia.

Se observan resultados análogos con el ácido aromático, ácido nicotínico, pKa 2,2, que mostró una interferencia parcial en la reacción de carbodiimida, mientras que su isómero, el ácido picolínico, con nitrógeno amina y grupo carboxilo (pKa 1,07) en estrecha proximidad no tuvo efecto.

Por lo tanto, los ácidos carboxílicos en ausencia de una amina en estrecha proximidad causan interferencia, especialmente si tienen valores bajos de pKa y están significativamente ionizados a pH 5. El TCA (pKa 0,7) está esencialmente completamente ionizado a pH 5 y causa interferencia severa. Por el contrario, el ácido píválico (pKa = 5,03, es decir, ionizado en ~50% a pH 5, en donde los átomos de cloro del tricloroacético se reemplazan por grupos metilo) mostró solo una inhibición parcial.

Por lo tanto, la explicación más sucinta de la falta de efecto de la glicina en las reacciones de carbodiimida en solución acuosa de los autores de la presente invención es que los centros con carga negativa y positiva interactúan, a través de enlaces de hidrógeno, formando anillos intramoleculares que conducen a una reducción en la reactividad del grupo carboxilo. Tales interacciones también deben implicar una o más moléculas de agua, ya que la glicina no forma zwitteriones en la fase gaseosa. Las estructuras en solución de incluso aminoácidos simples, tales como la glicina, son muy complejas, y se cree que están implicadas varias moléculas de agua en la estabilización de los iones híbridos de la glicina (Xu y col. J. Chem. Phys. 119, 10696-10701, 2003).

En general, en química, la formación de anillos de 5 o 6 miembros tiende a favorecer los anillos de 3 o 4 miembros altamente tensos, o anillos con 7 o más átomos. Por lo tanto, parece probable que los compuestos monocarboxílicos que no interfieren en la reacción de la carbodiimida de los autores de la presente invención hayan cargado amina y carboxilos que pueden interactuar directamente entre sí, o indirectamente a través de puentes de moléculas de disolvente (o posiblemente iones), para obtener anillos de 5 o 6 miembros con un bajo estado de energía. Sin embargo, cuando los grupos cargados son más remotos (es decir, separación de tres átomos), los anillos intramoleculares son demasiado grandes para favorecerlos termodinámicamente y el grupo carboxilo ionizado es libre de reaccionar con las carbodiimidas protonadas.

Por lo tanto, es probable que cualquier molécula con la característica estructural clave, es decir, amina y carboxilo en estrecha proximidad (y que carecen de otros grupos interferentes) con cada grupo sustancialmente ionizado, muestre una baja reactividad en una reacción de carbodiimida a pH 5. Cuando el pKa del carboxilo es suficientemente bajo (<4), la molécula también puede ser adecuada para la elución de columnas de anticuerpos.

Los tampones con la característica estructural clave pueden tener otras aplicaciones. Por ejemplo, el ácido picolínico (pKa de amina 5,52) es un tampón mucho mejor que MES (pKa 6,15) a valores de pH inferiores a 5. A estos valores de pH, la amina del ácido 2-picolínico estará ampliamente protonada y, por lo tanto, desactivará el grupo carboxilo. Curiosamente, el tampón MES se utiliza comúnmente en reacciones de carbodiimida a pH 4,7, a pesar del hecho de que MES no puede ser un tampón eficaz a este pH. El uso de MES a este pH quizás se explica por la preocupación por la interferencia esperada de los tampones con los grupos amina y carboxilo.

Si bien la glicina se puede tolerar en reacciones de carbodiimida entre anticuerpos y partículas carboxiladas a un pH de alrededor de 5, es probable que la amina primaria de la glicina sea mucho más reactiva en las reacciones de conjugación llevadas a cabo a valores de pH más altos (p. ej., reacciones de éster de NHS), puesto que es menos probable el grupo amino que sea protonado. Los autores de la presente invención razonan que las moléculas de ácido que incorporan aminas secundarias o terciarias, o una sal de amonio cuaternizada, en oposición a una amina primaria (como en la glicina), podrían mostrar una menor interferencia en las reacciones de conjugación basadas en lisina llevadas a cabo a valores de pH más altos, suprimiendo todavía la actividad de grupos carboxilo en reacciones de carbodiimida a un pH de alrededor de 5.

Los supuestos CFEB de las pruebas iniciales en reacciones de mediación de carbodiimida se probaron en una tecnología de conjugación basada en amina disponible comercialmente (Lightning-Link; Innova Biosciences; Patentes del Reino Unido Núm. 2446088 y 2467041). La glicina (datos no mostrados) y la prolina (una amina secundaria) causaron una interferencia significativa a una concentración de 50 mM en las reacciones de conjugación de fluoresceína Lightning-Link. El ácido 2-picolínico mostró moderada interferencia. La glicina betaína (una sal de amonio cuaternizada) y la N,N-dimetilglicina (amina terciaria) tuvieron poco o ningún efecto (% de valores de control de 98%, 96% a una concentración de 50 mM, respectivamente). Se muestran curvas de dosis-respuesta completas para productos conjugados preparados en presencia de glicina betaína frente a controles sin aditivo (Fig. 1). La figura muestra que no hay un efecto dependiente de la concentración de betaína a varias concentraciones en una reacción Lightning-Link. Control (sin betaína), cuadrados; betaína 1 mM, triángulos; betaína 10 mM, círculos abiertos; betaína 50 mM, círculos cerrados.

La tricina (una amina secundaria) se evaluó en una reacción Lightning-Link con una proteína fluorescente, la ficoeritrina. Hubo un grado modesto de interferencia en la reacción de conjugación a una concentración de 50 mM (91% de control). Las curvas de dosis-respuesta se muestran en la Fig. 2. La figura muestra que no hay un efecto dependiente de la concentración de tricina a varias concentraciones en una reacción Lightning-Link. Control (sin tricina), cuadrados; tricina 1 mM, triángulos; tricina 10 mM, círculos abiertos; tricina 50mM, círculos cerrados.

La glicina betaína se evaluó adicionalmente en reacciones de isotiocianato (Fig. 3) y éster de NHS (Fig. 4) y se comparó con los dos tampones más comunes utilizados en el trabajo de purificación de anticuerpos, la glicina y el

ácido cítrico. La Figura 3 muestra la proporción de moles de colorante con respecto a los moles de proteína para los productos conjugados de anticuerpo-colorante preparados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en presencia de diversos aditivos. La betaína y el ácido cítrico proporcionaron resultados similares a los del control (sin aditivos). La glicina mostró una interferencia significativa. La Figura 4 muestra la proporción de moles de colorante con respecto a los moles de proteína para los productos conjugados de anticuerpo-colorante preparados con éster de NHS-fluoresceína en presencia de diversos aditivos. La betaína y el ácido cítrico proporcionaron resultados similares a los del control (sin aditivos). La glicina mostró una interferencia sustancial. En contraste con sus potentes efectos inhibidores en las reacciones de carbodiimida (Tabla 1), el ácido cítrico se podría tolerar en reacciones dependientes de aminas. Como se esperaba, la glicina causó una interferencia significativa, especialmente con los ésteres de NHS. La glicina betaína fue bien tolerada en ambas pruebas.

Si bien la ausencia de la amina primaria de la glicina evitaría cualquier competencia con las lisinas de anticuerpos en las reacciones de éster o isotiocianato de NHS, la molécula resultante (es decir, ácido acético) no es adecuada para la elución de columnas de afinidad puesto que el pKa del grupo ácido (4,76) es demasiado alto y, por lo tanto, no puede actuar como un tampón en el intervalo de pH requerido. Además, el ácido acético muestra una mayor interferencia en las reacciones de carbodiimida que la glicina, a pesar de que el ácido acético tiene una proporción significativa de sus carboxilos en la forma protonada no reactiva.

A menudo se introducen nuevos grupos funcionales (p. ej., tioles protegidos) en los anticuerpos (y en otras sustancias que contienen amina) para ampliar el intervalo de posibles reacciones de derivatización que pueden llevarse a cabo. Estas modificaciones casi siempre utilizan moléculas heterobifuncionales con un grupo éster de NHS en un extremo. Dado que todos los derivados de NHS muestran esencialmente la misma reactividad con las aminas primarias, la betaína es compatible con una gama muy amplia de reacciones populares de conjugación de NHS.

Los tioles también se pueden incorporar directamente a los anticuerpos utilizando técnicas no dependientes de ésteres de NHS. Por ejemplo, el 2-iminotiolano se puede utilizar para modificar restos de lisina para incorporar grupos tiol. La Figura 5 muestra que la glicina reacciona rápidamente con el 2-iminotiolano y, por lo tanto, no puede tolerarse en reacciones de anticuerpos u otras sustancias que contienen amina con el 2-iminotiolano. El ácido cítrico, como se esperaba, no tuvo efecto sobre esta reacción concreta dependiente de amina, y el compuesto de amonio cuaternario glicina betaína no tuvo efecto nuevamente.

Otros compuestos de amonio cuaternario también son CFEB adecuados, por ejemplo, prolina betaína por analogía con glicina betaína.

Preferiblemente, las aminas primarias tienen un valor de pKa de >9 o >10 , o el valor de pKa debe ser al menos 1 unidad o preferiblemente 2 unidades por encima del pH de la reacción de conjugación prevista, de modo que la amina esté en gran medida protonada y sea relativamente poco reactiva. Las aminas secundarias son más preferidas que las aminas primarias y las aminas terciarias son más preferidas que las aminas secundarias. Se prefieren particularmente las sales de amonio cuaternario, ya que el átomo de nitrógeno retiene una carga positiva a todos los valores de pH.

En la cromatografía de afinidad, para lograr altas recuperaciones, las columnas generalmente se eluyen entre pH 2,3 y pH 3,5; más comúnmente el pH es pH 2,3, pH 2,8 o pH 3,0. El anticuerpo eluido se debe neutralizar rápidamente para evitar daños inducidos por el pH. En el caso de un CFEB, solo es necesario neutralizar la solución antes de la conjugación (es decir, de manera muy importante, no se requiere diálisis), seguido más adelante por un simple ajuste de pH, si fuera necesario, para cumplir con los requisitos de la reacción de conjugación concreta de interés.

Preferiblemente, el CFEB debe tener un pKa por debajo del pH utilizado para la elución de la columna de afinidad.

Si bien es tradicional utilizar tampones a un valor de pH cercano al valor de pKa, en la presente invención existe una clara ventaja durante la etapa de neutralización al no tener que moverse a través del punto de máxima resistencia del CFEB al cambio de pH, es decir, el punto en el que el pH es igual al valor de pKa. No obstante, el CFEB aún debe ser un tampón eficaz con los valores de pH a los que se utilizará. En general, el intervalo de almacenamiento intermedio útil se considera pKa ± 1 unidad. Al utilizar un pH hacia el extremo superior del intervalo de amortiguación útil, se requiere una menor cantidad de tampón neutralizante, y el anticuerpo neutralizado tiene la capacidad de amortiguación global más baja posible. Esto es importante ya que las reacciones de conjugación posteriores se pueden llevar a cabo a muchos valores de pH diferentes y el uso previsto del anticuerpo puede no conocerse cuando el anticuerpo se purifica y neutraliza. Si la solución en la que se formula el anticuerpo tiene una capacidad de amortiguación baja, el anticuerpo puede ajustarse fácilmente a cualquier valor de pH nuevo mediante la adición de un tampón más potente.

La concentración de CFEB debe ser suficiente para interrumpir la unión del anticuerpo, pero no se debe utilizar más de lo absolutamente necesario para facilitar la etapa de neutralización posterior. La concentración de CFEB es

preferiblemente inferior a 200 mM, más preferiblemente inferior a 100 mM e incluso más preferiblemente inferior a 50 mM.

La eficacia de la elución de una columna de afinidad se determina en parte por la concentración de CFEB, ya que la columna antes de la elución típicamente se lava con un tampón de pH 7,5 para eliminar las proteínas que no son anticuerpos. Por lo tanto, si el tampón de lavado es 50 mM, la transición a pH bajo con, por ejemplo, CFEB 10 mM no será tan abrupta como con CFEB 50 mM, ya que inevitablemente habrá una mezcla de los tampones en la parte superior de la columna cuando se esté introduciendo el nuevo tampón

Idealmente, por lo tanto, se podría utilizar una pequeña cantidad de tampón débil a un pH de alrededor de 7 para desplazar un tampón de equilibrio/lavado más potente antes de la adición de CFEB. Alternativamente, y más preferiblemente, la columna se debe equilibrar y lavar con una solución única de capacidad amortiguadora relativamente baja, antes de la elución a bajo pH. La fuerza iónica se puede mantener, si fuera necesario, incluso después de cualquier reducción de la concentración del tampón, añadiendo una sal no amortiguadora (p. ej., la sal de un ácido fuerte y una base fuerte), como NaCl.

En el caso de las purificaciones de anticuerpos a pequeña escala, el tampón de lavado de la columna se puede eliminar en gran medida mediante la centrifugación de la matriz de la columna de afinidad para expulsar el líquido, aunque se debe tener cuidado de no permitir que la matriz se seque, lo que podría dañar el anticuerpo unido.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, el CFEB es el compuesto de amonio cuaternario, glicina betaína, que tiene un pKa de 1,8, significativamente por debajo del pH normalmente utilizado para eluir las columnas de afinidad (p. ej., pH 2,3 y pH 2,8).

Si la columna se eluye a un pH más alto (p. ej., pH 3,0), se puede seleccionar un tampón de elución con pKa ligeramente más alto; por ejemplo, tricina, que tiene un valor de pKa para su grupo carboxilo comparable al de la glicina (pKa 2,3). Alternativamente, se podría utilizar una concentración ligeramente más alta de una betaína tal como la glicina betaína para mantener la capacidad de amortiguación requerida, incluso fuera del intervalo de amortiguación normal (es decir, en el ejemplo anterior $\text{pH} = \text{pKa} + 1,2$, en lugar de $\text{pKa} + 1,0$).

Otras sustancias que se utilizan en la purificación del anticuerpo (tampón de equilibrio de columna, tampón de lavado y sustancias neutralizantes) también deben ser compatibles con la reacción de conjugación prevista para no negar los beneficios de utilizar un CFEB para la elución.

Si bien se utilizan comúnmente TBS (solución salina tamponada con Tris) y PBS (solución salina tamponada con fosfato) como tampones de equilibrio/lavado en la cromatografía de afinidad, ninguno de estos se prefiere en un procedimiento de purificación de anticuerpos basado en CFEB, a menos que se utilice una estrategia de desplazamiento de tampón previa a la elución. Tris interfiere en las reacciones dependientes de amina y PBS interfiere en las reacciones de carbodiimida.

Sin embargo, muchos tampones utilizados en biología con valores de pKa superiores a 6 son adecuados para su uso en reacciones de conjugación. Los tampones con grupos sulfonato y anillos de piperazina o morfolino se utilizan comúnmente y son compatibles con la mayoría de las reacciones de conjugación, suponiendo que estén ausentes del tampón otros grupos funcionales potencialmente interferentes. Dentro de una clase, estos tampones a menudo varían solo en el número y la posición de los grupos metileno o sustituyentes hidroxilo.

La clase de tampones de piperazina incluye, pero no se limita a: (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico) (HEPES) (pKa 7,5); Ácido 3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]propanosulfónico (EPPS o HEPPS) (pKa 8,0); piperazin-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico) (TUBOS) (pKa 6,76); N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(ácido 2-hidroxipropanosulfónico) (HEPPSO) (pKa 7,8); N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(ácido 4-butanosulfónico) (HEPBS) (pKa 8,3).

La clase de tampones de morfolino incluye, pero no se limita a: Ácido 3-morfolino-2-hidroxipropanosulfónico (MOPSO) (pKa 6,9); ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) (pKa 6,1); ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) (pKa 7,2).

Otra clase de tampones con valores de pKa relativamente altos incluye, entre otros, los derivados de N-ciclohexilo: Ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico (CHES) (pKa 9,5); ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico (CAPS) (pKa 10,4); ácido 4-(ciclohexilamino)-1-butanosulfónico (CABS) (pKa 10,7); ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxil-1-propanosulfónico (CAPSO) (9,6).

Existen otras variaciones estructurales en los tampones anteriores y se puede encontrar una lista más detallada en Goldberg et al (J. Phys. Chem. Ref. Data, Vol. 31, Núm. 2, 2002).

Generalmente, todos los tampones anteriores son sustancias neutralizantes y/o sustancias amortiguadoras

potencialmente útiles y se tolerarán en la mayoría de las reacciones de conjugación. La elección del tampón o tampones dependerá del uso previsto del anticuerpo y especialmente del pH de la solución final que se requiera.

5 En una realización de la presente invención, los tampones indicados anteriormente con valores de pKa en el intervalo $pK_a = 8 \pm 1$ unidades, son tampones de equilibrio y de lavado preferidos. Estos incluyen MOPS, HEPES, EPPS, pero esta selección no es limitante.

10 Con respecto a los tampones de neutralización, cualquiera de los tampones mencionados anteriormente son tampones potencialmente adecuados. Sin embargo, la elección del tampón (o tampones, véase más abajo) debe tener en cuenta el pH final que se requiera y la idoneidad de los valores de pKa de los tampones.

15 En una realización preferida de la presente invención, el tampón neutralizante tiene un pH superior a su valor de pKa, de modo que se requiere la menor cantidad posible de sustancia amortiguadora para neutralizar la solución de anticuerpo que contiene CFEB. Por ejemplo, se podría preparar una solución de tampón EPPS ($pK_a 8,0$) a pH 9,0. Al añadir un volumen específico del tampón de neutralización a una concentración especificada a un volumen específico del anticuerpo eluido en CFEB, el pH final se puede modificar para que esté alrededor del pH fisiológico, aún dentro del intervalo de amortiguación útil del tampón EPPS.

20 También es posible utilizar tampones neutralizantes fuera de su intervalo amortiguador útil. Por ejemplo, el tampón Hepes ($pK_a 7,5$) se podría utilizar a un pH de alrededor de 9, suponiendo que se tenga mucho cuidado para evitar el riesgo de exceso al ajustar el pH en una región de muy baja capacidad de amortiguación. Por lo tanto, el exceso de base (p. ej., NaOH) que ha elevado el tampón fuera de su intervalo normal de amortiguación (es decir, $pK_a \pm 1$ unidad) neutraliza parte del ácido en el anticuerpo eluido, formando sal, minimizando así la masa y la concentración final de sustancia amortiguadora neutralizante real (es decir, en este caso, Hepes).

25 La mayoría de las reacciones de conjugación de anticuerpos tienen lugar entre pH 5 y pH 9, ya que en las reacciones más comunes participan ésteres de NHS (reacciones típicamente a un pH de alrededor de 8), maleimidas (alrededor de 6,5-7,5), carbodiimidas (generalmente alrededor de pH 5-6) y reactivos de tiolación (típicamente alrededor de pH 8-8,5).

30 En una realización preferida de la presente invención, el tampón de neutralización comprende dos sustancias amortiguadoras, una (el 'componente de alto pKa') con un pKa superior a 8, por ejemplo, preferiblemente alrededor de pKa 9 o pKa 10, y la otra (el 'tampón de captura ') con un pKa de alrededor de 7.

35 Los dos componentes del tampón de neutralización se pueden añadir por separado o como una mezcla.

Cuando los dos componentes se añaden por separado, preferiblemente el tampón de captura se añade antes del componente de alto pKa para evitar sobrepasar valores altos de pH cuando se añade el componente de alto pKa.

40 En el trabajo exploratorio con un nuevo CFEB existen ventajas al realizar adiciones separadas, ya que el componente de alto pKa se puede añadir en incrementos y medir el pH después de cada adición. Posteriormente, se puede realizar una sola adición de una solución combinada de componente de alto pKa/tampón de captura para lograr el mismo punto final premezclando las dos sustancias en las cantidades requeridas.

45 Alternativamente, un volumen conocido de varios CFEB potenciales (o un CFEB a diferentes valores de pH) se puede mezclar con volúmenes variables de cada una de una serie de amortiguadores de neutralización potenciales, y el pH final en cada caso se puede determinar y tabular. En experimentos posteriores, dependiendo del volumen medido del anticuerpo en CFEB, se pueden consultar las tablas para determinar qué tampón de neutralización utilizar y cuánto añadir para lograr el pH final requerido.

50 Tras la adición de los dos componentes amortiguadores que da como resultado la neutralización del anticuerpo eluido, se crea un sistema de triple tampón que comprende el CFEB, el componente de alto pKa y el tampón de captura (ignorando el anticuerpo y cualquier otra especie de tampón presente a muy baja concentración).

55 Es probable que el componente de alto pKa provenga de la serie de tampones de N-ciclohexilo, que generalmente tienen valores de pKa relativamente altos, aunque no se pretende que esto sea limitante.

60 El pH del tampón de neutralización es preferiblemente superior a pH 7, más preferiblemente superior a 8, e incluso más preferiblemente en algún lugar entre pH 8,5 y pH 11. Un pH de alrededor de pH 9-9,5 es particularmente útil, lo que es poco probable que dañe el anticuerpo al entrar en contacto la mezcla CFEB. Por supuesto, se puede utilizar un pH más bajo en el caso de anticuerpos que sean sensibles al pH alto.

Si se utiliza un componente de pKa alto, el pH de la solución neutralizante idealmente está dentro de una unidad del valor de pKa. Si el pH está por encima del valor de pKa, se requerirá una cantidad menor de sustancia

amortiguadora para neutralizar el CFEB que si el pH está por debajo del pKa. Sin embargo, dado que el componente de alto pKa tendrá poco poder de amortiguación a un pH neutro, la cantidad utilizada para neutralizar el CFEB no es particularmente importante y el componente de alto pKa no resistirá movimientos adicionales en el pH fuera del pH 7, si fuera necesario.

Cuando se añade el tampón neutralizante al anticuerpo eluido con CFEB, que generalmente tiene un pH de alrededor de 2,3-3,0, la mezcla se volverá más neutra. Con una selección juiciosa de los volúmenes de anticuerpos (en CFEB) y el tampón neutralizante, el tampón de captura podrá mantener (es decir, 'capturar') el pH en el intervalo de pH 6 y 8 (es decir, tampón de captura pKa +/- 1 unidad de pH).

Sin embargo, el tampón de captura, que idealmente está presente en la concentración más baja posible, debe estar presente en cantidad suficiente para tolerar ligeras variaciones de la razón en volumen de la solución de CFEB y el tampón neutralizante, como puede ocurrir, por ejemplo, por pipeteo o inexactitudes de medición, para asegurarse de que el pH esté dentro del intervalo deseable para el almacenamiento de anticuerpos. Es deseable una concentración final de alrededor de 10 mM, aunque esto no es limitante.

Si el tampón de captura se añade antes del componente de alto pKa, este último debe añadirse rápidamente, ya que el tampón de captura no es normalmente la sustancia neutralizante primaria.

Después de que una muestra de anticuerpo haya sido neutralizada, el componente de alto pKa que se origina en la solución neutralizante ya no es un tampón eficaz. Del mismo modo, el CFEB, que tiene un pKa ampliamente (pero preferiblemente por debajo) del pH de elución de la columna (es decir, en la región alrededor de pH 2,5) no es un tampón eficaz a pH 7. En cambio, el tampón de 'captura' (con un pKa alrededor de 7), que está presente a una concentración relativamente baja, proporciona todo el poder de amortiguación eficaz, pero el pH de la solución se puede mover con relativa facilidad a un nuevo valor de pH dentro del intervalo de pH 5 a pH 9 mediante la adición de un cuarto tampón (o ácido o base). Incluso dentro de este amplio intervalo de valores, ni el componente amortiguador de alto pKa (suponiendo que pKa >9, preferiblemente 9,5 o superior) ni el CFEB son particularmente eficaces para resistir cualquier cambio deseado en el pH.

Las características estructurales del tampón de captura son similares a las requeridas por los tampones de neutralización, excepto que idealmente deberían tener un valor de pKa alrededor de pH 7. Preferiblemente, el pKa debería estar entre pH 6 y 8, y el pH final alrededor de 7-7,5, aunque puede ser posible operar fuera de este intervalo suponiendo que el anticuerpo sea estable al valor de pH final elegido.

Los tampones de captura preferidos incluyen MOPS (pKa 7,2) y HEPES (pKa 7,5) pero esto no es limitante. Otros tampones con valores de pKa similares también se pueden utilizar como tampones de captura.

Las combinaciones preferidas de componente con alto contenido de pKa y tampón de captura (ya se añadan por separado o juntos) incluyen CHES y MOPS o HEPES. De nuevo, estas combinaciones no son limitantes.

Finalmente, se pueden utilizar algunos tampones carboxílicos que contienen amina, a valores de pH apropiados, ya sea como CFEB o como tampones de neutralización (p. ej., tricina y la molécula relacionada bicina).

A partir de la teoría de los tampones, resultará evidente que se pueden crear muchas soluciones de múltiples componentes y baja capacidad de amortiguación a un pH de alrededor de 7 combinando diferentes CFEB con soluciones neutralizantes que comprenden un componente de alto pKa y un tampón de captura. Los componentes concretos en el tampón de neutralización no están limitados, excepto que claramente ninguno debe tener grupos funcionales que interfieran en las reacciones de conjugación previstas. Las reacciones de conjugación que utilizan los métodos de la presente invención consisten en poner en contacto la mezcla de anticuerpo/CFEB a un pH adecuado con una mezcla de componentes que comprendan una marca activada (o marca más sustancias químicas activadoras), tampón y otros aditivos según sea necesario. En algunos casos, en lugar de una marca, se ancla una molécula pequeña que porta un grupo funcional útil, típicamente para permitir la posterior unión de una marca a través del grupo funcional. El orden preciso de adición puede variar dependiendo de la naturaleza de la reacción de conjugación, pero en última instancia, se ponen en contacto simultáneo un CFEB, tampón de captura y/o tampones neutralizantes, marca (o reactivo de derivatización) y anticuerpo (o proteína que se debe marcar) al comienzo de la reacción de conjugación, que es un aspecto único del presente enfoque. Este concepto se desarrolló después del hallazgo inesperado de que los aminoácidos, tales como la glicina, en ciertas circunstancias, pueden ser tolerados en reacciones mediadas por carbodimida entre anticuerpos y nanopartículas.

En cualquier reacción de marcaje, es importante que la solución de anticuerpo neutralizado, cuando se añade a una reacción, no aleje el pH de la mezcla del pH de conjugación deseado. Cuando el anticuerpo representa una pequeña proporción del volumen de reacción total y cuando la capacidad de amortiguación de la solución de anticuerpo es baja, la probabilidad de un cambio de pH significativo es baja. Por lo tanto, un anticuerpo formulado con un CFEB y un tampón de neutralización adecuado y añadido en un volumen adecuado será compatible con muchas reacciones

de conjugación tamponadas diferentes.

Si el anticuerpo neutralizado está bastante diluido y la adición de volumen representara una fracción significativa del volumen total del ensayo, la especie de amortiguación primaria en la reacción de conjugación debe estar suficientemente concentrada para aceptar la muestra de anticuerpo sin ningún cambio significativo en el pH. Alternativamente, el volumen a añadir se podría reducirse aumentando la concentración de anticuerpos utilizando mecanismos simples bien conocidas en la técnica (p. ej., microconcentración).

Sin embargo, si la intención es llevar a cabo solo un tipo de reacción de conjugación, el anticuerpo en CFEB se puede neutralizar y ajustar directamente al pH de conjugación requerido. En este caso, no se necesita flexibilidad para ajustar el pH a otros valores, pero todavía existe un beneficio importante para evitar las etapas de diálisis previas a la conjugación.

Por ejemplo, si la reacción de conjugación se lleva a cabo a pH 9, el anticuerpo simplemente se puede ajustar a pH 9. En este escenario, no es necesario el uso de un tampón de captura con pKa de alrededor de 7; más bien, se mezclaría un tampón ligeramente por encima de pH 9 (y con un pKa idealmente de alrededor de 9) con el anticuerpo eluido a la razón en volumen requerida para lograr el pH final requerido.

Si solo se conjuga a pH 9 una parte del anticuerpo, sería preferible ajustar solo una parte del anticuerpo a pH 9, o neutralizar la solución completa de anticuerpo con CFEB a de alrededor de pH 7 utilizando un tampón de captura adecuado combinado con un tampón de neutralización de alto pKa. El pH de una porción de la solución neutralizada podría entonces elevarse a pH 9 cuando fuera necesario.

La necesidad de neutralizar los anticuerpos eluidos en un CFEB con volúmenes precisos de tampones de neutralización es menos crítica cuando se manejan grandes volúmenes de anticuerpos (es decir, varios ml o incluso litros), ya que se puede insertar una sonda de pH en la solución de anticuerpos. Deseablemente, se añade rápidamente un tampón alcalino con un pKa apropiado (o una combinación de tampón de captura y un componente de alto pKa a un pH adecuado) al CFEB sin preocuparse por el pH final exacto, excepto que debe elevarse lo suficiente para minimizar el daño inducido por el pH al anticuerpo y, preferiblemente, el pH se detiene en un punto por debajo del pH que finalmente se requiere. El ajuste final al pH correcto se puede realizar utilizando un medidor de pH y la adición de una base adecuada (p. ej., solución o tampón de NaOH) o ácido (p. ej., HCl diluido) si el pH se sobrepasa durante la etapa de neutralización.

Mediante la selección cuidadosa del tampón de elución, su concentración, el pKa de sus grupos ionizables y el pH del tampón de elución (especialmente con respecto a su valor de pKa), el anticuerpo se puede neutralizar fácilmente con un tampón o combinación de tampones de pH más alto (y con valores de pKa cuidadosamente seleccionados), sin limitar de ninguna manera el uso futuro del anticuerpo en diferentes tipos de reacciones de conjugación.

También es posible eluir columnas de afinidad de antígeno con soluciones de alto pH (pH >10) en lugar de soluciones de bajo pH. Los mismos requisitos de la CFEB se aplican aquí; el tampón de elución debe ser compatible con los tipos deseados de reacciones de conjugación. Con el cambio de una estrategia de elución de pH bajo a una de pH alto, la selección de un tampón de neutralización adecuado (es decir, ácido) se vuelve más difícil, ya que los tampones obvios (glicina, ácido cítrico) no están permitidos con muchas químicas de conjugación populares. Sin embargo, si se planifican reacciones no dependientes de la amina, puede ser posible utilizar ácido cítrico como tampón neutralizante. Si se prevén reacciones de carbodiimida, el tampón de neutralización podría ser glicina de pH bajo, quizás utilizado junto con un tampón de captura adecuado, aunque se preferiría la glicina betaína de bajo pH con un tampón de captura.

La N,N-dimetilglicina (pKa de amina de 9,8) es un buen candidato para la elución de columnas de afinidad a pH alto. En esta situación, el tampón de neutralización puede tener pKa de alrededor de 7 y añadirse como una solución a pH 6. O bien el tampón debe estar suficientemente concentrado para neutralizar el CFEB de pH alto, o bien se podría añadir un ácido (pero en muchos casos no ácido cítrico, ácido acético o glicina de pH bajo) para ajustar el pH, con seguimiento mediante un medidor de pH si fuera posible. El tampón con un pKa de alrededor de 7 funciona como un tampón de captura para evitar sobrepasar valores de pH muy bajos. El ácido clorhídrico a una concentración adecuada sería una elección obvia pero no limitante de ácido neutralizante. Alternativamente, se podría utilizar la glicina betaína de pH bajo, preferiblemente combinada con un tampón de captura de pKa ~7, como se describió anteriormente, para neutralizar una solución de pH alto utilizada para la elución de la columna de afinidad.

Utilizando los métodos de la presente invención, las mezclas de tampones con concentraciones y valores de pKa cuidadosamente seleccionados simplemente se combinan con una preparación de anticuerpo eluido en un tampón CFEB, proporcionando una solución neutra de múltiples componentes para el almacenamiento de anticuerpos, cuyo pH posteriormente puede cambiarse fácilmente dentro del intervalo de pH de 5 a 9 para adaptarse a casi cualquier reacción de conjugación. es decir, reacciones que implican reacciones de éster de NHS, reacciones de isotiocianato,

reacciones que implican reactivos de tiolación y conjugación de anticuerpos contra nanopartículas mediada por carbodiimida.

Ejemplos:

Ejemplo 1. Ensayo de flujo lateral.

Se prepararon tiras de prueba de flujo lateral (4 mm de ancho) a partir de membrana de nitrocelulosa (Millipore Hi Flow plus 90) rayadas con IgG de cabra anti-conejo (línea de prueba) y biotina-BSA (línea de control). Las tiras se alojaron en cartuchos de plástico y se añadieron muestras de producto conjugado de oro (80 µl) a la almohadilla de muestra. Los cartuchos se dejaron en reposo durante 30 minutos y a continuación se leyeron utilizando un lector ESE-Quant GOLD - QIAGEN. Cada muestra se enriqueció con una cantidad fija de estreptavidina-oro (Innova biosciences - Código del producto: 250-0200), que se une a la línea de control, para verificar que cada tira de prueba se haya ejecutado correctamente y que los datos de la línea de prueba sean válidos.

Ejemplo 2. Ensayos de fluorescencia.

Se incubaron placas de 96 pocillos de color negras (Greiner Bio-One (código 655077)) con 50 µg de IgG de conejo (1 µg/pocillo) durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con TBS/BSA al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron cinco veces con TBS (tampón de lavado). Los productos conjugados de anticuerpos fluorescentes se diluyeron seriadamente en TBS/BSA al 0,1% y se añadieron alícuotas de 50 µl a los pocillos por triplicado. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, la placa se lavó cinco veces y se leyó la emisión de fluorescencia utilizando un lector de placas Tecan Infinite M200 con el soporte lógico i-Control 1.4 con los ajustes de excitación/emisión apropiados (fluoresceína, 490 nm/535 nm; ficoeritrina, 535 nm/575 nm). Los datos de fluorescencia se trazaron en función de la dilución del producto conjugado. Para comparar los resultados de los aditivos probados en diferentes experimentos, los datos se transformaron en un porcentaje de un valor de control (es decir, la señal para el producto conjugado preparado en ausencia de cualquier aditivo de prueba).

Ejemplo 3. Reacciones de conjugación con oro carboxilado

Se utilizaron 10 µg de IgG de cabra anti-conejo (GAR) por ml de nanopartículas de 40 nm aplicadas como recubrimiento con funcionalidad carboxilo (InnovaCoat GOLD, Innova Biosciences) a DO 10,0 en presencia de aditivos a una concentración final 50 mM. Típicamente, las reacciones se ajustaron con las siguientes adiciones: 40 µl de nanopartículas de oro 40 nm InnovaCoat (carboxiladas), se incubaron 5 minutos con 4 µl de GAR de 0,1 mg/ml, 20 µl de agua y 80 µl de tampón MES 100 mM que contenía aditivo 100 mM, pH 5,0. A continuación, se añadieron 16 µl de EDC 1 mM y después de 10 minutos de incubación a 22°C, se añadieron 20 µl de TBS 10X/Tween20 al 1% y 20 µl de agua para proporcionar el producto conjugado de DO 2.

Los productos conjugados de oro se mezclaron cuando se requirió con IgG de conejo ((concentración final 50 ng/ml) a 22°C. Los productos conjugados tenían una concentración final de DO 0,2 (es decir, dilución 1/10 de los productos conjugados de partida). Las muestras se ejecutaron por triplicado en tiras de ensayo de flujo lateral como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 4. Efecto de varios aditivos sobre las reacciones de conjugación de fluoresceína Lightning-Link.

Las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo convencional del fabricante, excepto que los aditivos se incluyeron a una concentración de hasta 50 mM en las reacciones de conjugación de IgG de cabra anti-conejo utilizando el kit Lightning-Link de fluoresceína (código de producto 707-0010, Innova Biosciences, Reino Unido). Los productos conjugados se probaron de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 2. Las curvas de dosis-respuesta para los productos conjugados preparados en presencia de glicina betaína se muestran en la Fig. 1, y el % de valores de control para los productos conjugados (dilución 1/100) preparados en presencia de los siguientes compuestos (valores entre paréntesis) fueron: prolina (53%), glicina betaína (98%), N,N-dimetilglicina (96%), ácido 2-picolínico (83%) en comparación con controles sin aditivos (100%).

Ejemplo 5. Efecto de la tricina en reacciones de conjugación de ficoeritrina Light-Link.

El método fue como se describe en el Ejemplo 4, excepto que la IgG de cabra anti-conejo se conjugó con la proteína fluorescente ficoeritrina (PE) utilizando un kit de conjugación Lightning-Link PE (703-0005). Las curvas de dosis-respuesta para productos conjugados de ficoeritrina preparados en presencia de tricina se muestran en la Fig. 2. La tricina tiene poco efecto sobre las reacciones de conjugación Lightning-Link PE en el intervalo de concentraciones probadas. En este caso, el producto conjugado preparado a la concentración más alta de tricina (50 mM) proporcionó una señal que era 91% del valor de control en ausencia de aditivo.

Ejemplo 6: Efecto de los aditivos en las reacciones de isotiocianato.

Se incubaron 40 µg de IgG de conejo de 10 mg/ml durante la noche en la oscuridad a 22°C con FITC 50 µM en tampón CHES 80 mM de pH 9,0 que contenía 50 mM de un aditivo (uno de glicina betaína, ácido cítrico o glicina). Los productos conjugados se desalaron en columnas PD10 (GE Healthcare) en tampón TBS y los valores de absorbancia de las soluciones eluidas se determinaron a 280 nm y 495 nm. La proporción de moles de colorante con respecto a moles de proteína para productos conjugados de anticuerpo-colorante en presencia de diversos aditivos se muestra en la Fig. 3. La glicina mostró una interferencia significativa, mientras que la glicina betaína y el ácido cítrico proporcionaron resultados similares a los del control (es decir, sin aditivo).

Ejemplo 7: Efecto de los aditivos en las reacciones de éster de NHS

Se incubaron 40 µg de IgG de conejo de 10 mg/ml durante 30 minutos en la oscuridad a 22°C con colorante de fluoresceína-NHS 50 µM en fosfato de sodio 80 mM de pH 8,0 que contenía 50 mM de uno de varios aditivos (de glicina betaína, ácido cítrico o glicina). Los productos conjugados se desalaron en columnas PD10 equilibradas en tampón TBS y los valores de absorbancia de las soluciones eluidas se determinaron a 280 nm y 495 nm. La proporción de moles de colorante con respecto a moles de proteína para los productos conjugados de anticuerpo-colorante en presencia de diversos aditivos se muestra en la Fig. 4. La glicina betaína y el ácido cítrico proporcionaron resultados similares a los del control (sin aditivo), mientras que la glicina mostró una interferencia sustancial.

Ejemplo 8: Efecto de los aditivos sobre el reactivo de tiolación 2-iminotiolano

Se añadieron por triplicado muestras de 200 µl de fosfato de sodio 100 mM de pH 8,0 que contenía 80 ng/ml de DTNB y 50 mM de aditivo (glicina betaína, ácido cítrico o glicina) a una placa transparente de 96 pocillos (Greiner Bio-One, código 655077). Se añadieron 20 µl de 2-iminotiolano 2 mM a cada pocillo y se mezclaron rápidamente y los valores de absorbancia se leyeron a 405 nm cada minuto durante 30 minutos utilizando un lector de placas Tecan Infinite M200 con el soporte lógico i-Control 1.4. La liberación de tioles a partir de 2-iminotiolano se muestra en la Fig. 5. La figura muestra la liberación de tioles en una reacción de apertura del anillo de 2-iminotiolano. En la reacción de control, hay un aumento lineal constante de la absorbancia a medida que el reactivo es hidrolizado por el agua. No hay aumento en esta velocidad en presencia de betaína o ácido cítrico (curvas superpuestas con la del control). En presencia de glicina, se produce una hidrólisis rápida y la apertura del anillo de 2-iminotiolano. Ni la glicina betaína ni el ácido cítrico liberaron tioles más rápido de lo que se observó en la reacción de control (sin aditivos). El aumento del valor basal se puede atribuir a la sensibilidad conocida del 2-iminotiolano a la hidrólisis a valores de pH alcalino.

Ejemplo 9. Uso de un tampón de captura y un componente de alto pKa para neutralizar una muestra de CFEB.

A 3 ml de glicina betaína, pH 2,25, se le añadió un tampón de 'captura' (30 µl de Hepes 1 M, pH 7,5) seguido de adiciones repetidas de 10 µl de un componente de alto pKa (tampón CHES 0,5 M de pH 9,5). El pH se midió después de cada adición. Después de la adición de 70 µl, 80 µl y 90 µl de tampón CHES de pH 9,5, los valores de pH de la mezcla fueron 7,27, 7,45 y 7,6. La Figura 6 muestra perfiles de pH completos con y sin el tampón de captura. La figura muestra la neutralización de 3 ml de CFEB (betaína, pH 2,25) con (círculo sólido) o sin tampón de captura (círculo abierto) (30 µl de Hepes 1 M, pH 7,5) seguido de adiciones repetidas de 10 µl de tampón CHES 0,5 M de pH 9,5. La adición del tampón de captura elevó el pH en aproximadamente 1 unidad de pH, por lo que las curvas tienen diferentes posiciones de partida. Más importante aún, el tampón de captura (pKa 7,5) resiste los cambios en el pH entre pH 7 y pH 8, lo que facilita el ajuste del pH a cualquier valor alrededor de pH 7,5, a pesar de la adición del tampón de neutralización a pH 9,5. En ausencia de tampón de captura, se observa una transición abrupta de pH 4,87 a pH 8,19 con una sola adición de 10 µl (de 90 µl a 100 µl) de tampón CHES.

Ejemplo 10. Columna de presentación

Las cuentas de Sefarosa anti-ratón de cabra se empaquetaron en una columna desechable (volumen empaquetado de 0,5 ml). Después de la incubación con una muestra que contenía IgG de ratón en TBS durante 2 horas, la columna se lavó con fosfato de sodio 10 mM/NaCl 150 mM, pH 8,0, y a continuación se eluyó con betaína 10 mM de pH 2,3. Se recogieron fracciones de 100 µl y se neutralizaron inmediatamente con 11,1 µl de un tampón A 10X que comprendía Hepes 50 mM (tampón de captura) y CHES 90 mM (componente de alto pKa). El tampón 10X A se preparó mezclando los volúmenes apropiados de Hepes 1 M de pH 7,5, CHES 0,5 M, pH 9,5 y agua. La razón en volumen de anticuerpo (en betaína) con respecto a tampón de neutralización proporciona una concentración de tampón de captura final de 5 mM y un pH de 7,1. Alternativamente, las fracciones eluidas se neutralizaron con 11,1 µl de tampón B 10X (Hepes 30 mM y tampón CHES 105 mM) para proporcionar una preparación de anticuerpo con tampón más débil (es decir, tampón de captura 3 mM) con un pH final de 7,55.

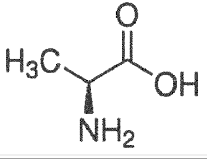
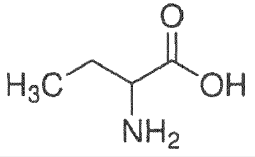
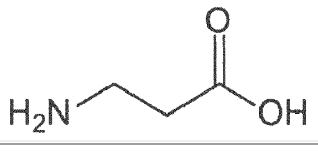
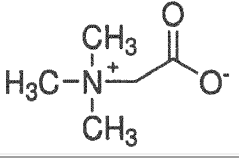
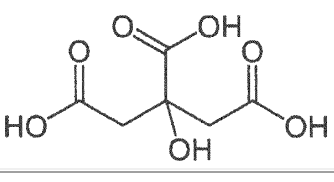
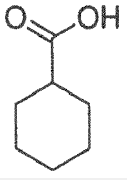
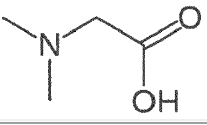
Los anticuerpos purificados (1 µg) se conjugaron con nanopartículas de oro carboxiladas de InnovaCoat (Innova Biosciences) en tampón MES 50 mM, pH 5,0, y se probaron en membranas de flujo lateral con IgG de ratón (de

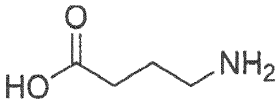
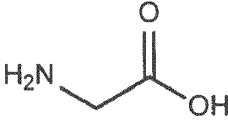
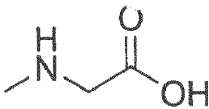
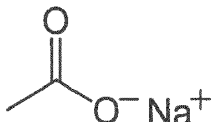
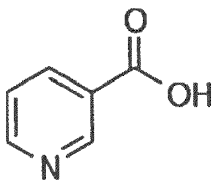
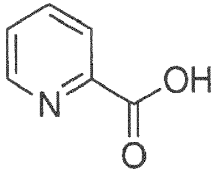
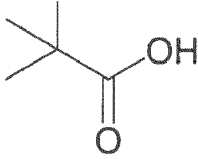
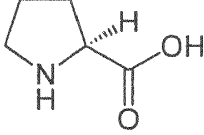
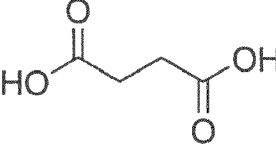
manera análoga al Ejemplo 1, pero con un anticuerpo diferente en la línea de prueba) utilizando IgG anti-ratón de cabra como reactivo puente. Las señales de flujo lateral fueron 165-277 unidades para productos conjugados de diferentes experimentos, en comparación con un valor de 193 unidades para IgG de ratón que no había sido sometido a cromatografía, y un valor de cero unidades para controles que carecen del reactivo puente.

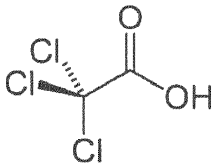
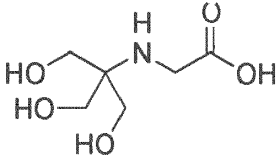
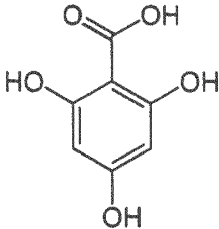
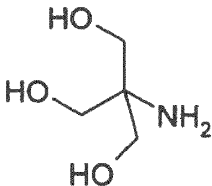
5 El tampón MES 50 mM, pH 5,0, (concentración final) utilizado en la reacción de conjugación está en el extremo de su intervalo de amortiguación útil, pero fue capaz de superar fácilmente los tampones de captura a una concentración de 3 mM y 5 mM; de hecho, fue suficiente MES alrededor de 40 mM para reducir el pH de las dos muestras a pH 5,0. Con una concentración de tampón de captura final de solo 1 mM de Hepes (y CHES a 10,5 mM)

10 solo se requiere MES 22 mM para reducir el pH al pH de reacción final de 5,0.

Tabla 1

<i>Aditivo</i>	<i>% de señal</i>	<i>pKa (COOH)</i>	<i>Estructura</i>
Alanina	100	pKa = 2,35	
Ácido DL-2 Aminobutírico	101	pKa = 2,29	
Beta-alanina	92	pKa = 3,6	
Betaina glicina	96	pKa = 1,83	
Ácido cítrico	0	pKa = 3,14	
Ácido ciclohexanocarboxílico	71	pKa = 4,9	
N,N-dimetilglicina	110	pKa ₁ = 2,06	

<i>Aditivo</i>	<i>% de señal</i>	<i>pKa (COOH)</i>	<i>Estructura</i>
GABA (ácido γ -aminobutírico)	26	$pK_{a1} = 4,23$	
Glicina	94	$pK_{a1} = 2,35$	
N-metilglicina (sarcosina)	93	$pK_{a1} = 2,36$	
Acetato de Na	37	$pK_{a1} = 4,76$	
Ácido nicotínico	73	$pK_{a1} = 2,201$	
2-Ácido picolínico	100	$pK_{a1} = 5,52$	
Ácido piválico	53	$pK_{a1} = 5,03$	
Prolina	94	$pK_{a1} = 1,99$	
Ácido succínico	0	$pK_{a1} = 4,2$	

<i>Aditivo</i>	<i>% de señal</i>	<i>pKa (COOH)</i>	<i>Estructura</i>
TCA	0	$pK_{a1} = 0,7$	
Tricina	105	$pK_{a1} = 2,3$	
Ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico	0	$pK_{a1} = 1,68$	
Tris	19	$pK_{a1} = 8,07$	
PBS (fosfato de sodio 25 mM, NaCl 150 mM) pH 7,2	15		
NaN3 al 0,01%	26	$pK_{a1} = 4,8$	Na^+ $\text{N}^{\ominus}=\text{N}^{\oplus}=\text{N}^{\ominus}$

REIVINDICACIONES

1. Un método para conjugar un anticuerpo aislado con una marca o reactivo de derivatización, cuyo método comprende poner en contacto el anticuerpo con una marca activada o reactivo de derivatización activado, o poner en contacto el anticuerpo con la marca o reactivo de derivatización en presencia de un reactivo de conjugación de anticuerpos, en un sistema amortiguador que comprende un compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico distinto de glicina, que porta un sustituyente amínico en la posición alfa o beta, en donde el reactivo de conjugación de anticuerpo o la marca activada comprende opcionalmente una carbodiimida, un éster de N-hidroxisuccinimida, una maleimida, un isotiocianato o un reactivo de tiolación, en donde el compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico opcionalmente comprende adicionalmente uno o más sustituyentes no amínicos o no comprende sustituyentes adicionales.
2. Un método según la reivindicación 1, en donde el sustituyente amínico del ácido monocarboxílico es opcionalmente una amina secundaria o terciaria, o amonio cuaternario, tal como una betaína, que es opcionalmente N,N,N-trimetilglicina, o en donde el compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico es un aminoácido primario, tal como alanina, beta-alanina o ácido 2-amino-butírico, o en donde el compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico es prolina, tricina, N-metilglicina, N,N-dimetilglicina o ácido 2-picolínico.
3. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el grupo carboxilo del compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico tiene un pKa en el intervalo de 1 a 4, tal como un pKa en el intervalo de 1,5 a 3,5, y en donde la amina del compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico opcionalmente tiene un pKa mayor que 8 o un pKa mayor que 9.
4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico está presente a una concentración de menos de 200 mM o menos de 100 mM o menos de 50 mM.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sistema amortiguador comprende además un compuesto amortiguador de neutralización que tiene un pKa mayor de 5,5, en donde el compuesto amortiguador de neutralización comprende opcionalmente un compuesto de morfolina, piperazina o N-ciclohexilo, tal como ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 3-morfolino-2-hidroxiopropanosulfónico (MOPSO), (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico) (HEPES), ácido 3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]propanosulfónico (EPPS o HEPPS), piperazin-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(ácido 2-hidroxiopropanosulfónico) (HEPPSO); N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(ácido 4-butanosulfónico) (HEPBS), ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico (CHES), ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico (CAPS), ácido 4-(ciclohexilamino)-1-butanosulfónico (CABS) o ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxil-1-propanosulfónico (CAPSO), en donde el sistema amortiguador opcionalmente comprende además un compuesto amortiguador de captura con un pKa en el intervalo de 6-8, en donde el compuesto amortiguador de neutralización tiene un pKa superior a 8, tal como en el intervalo de 8 a 11, cuyo tampón de captura es opcionalmente MOPS o HEPES y en donde la concentración del compuesto amortiguador de captura es opcionalmente menor que la concentración del compuesto amortiguador de neutralización.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la marca comprende una enzima, una proteína fluorescente, un colorante orgánico, una partícula coloreada, biotina, estreptavidina o un polímero y/o cuyo método se lleva a cabo a un pH en el intervalo de 5 a 9.
7. El uso de un tampón que comprende un compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico que porta un sustituyente amínico en la posición alfa o beta para eluir un anticuerpo de una fase sólida, en donde el pH del tampón está en el intervalo de 1,8 a 3,5, en donde el sustituyente amínico del ácido monocarboxílico es un amonio cuaternario, opcionalmente en donde la fase sólida está dispuesta en una columna, y adicionalmente de manera opcional en donde la fase sólida comprende una matriz de afinidad para el anticuerpo.
8. El según la reivindicación 7, en donde el compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico comprende adicionalmente uno o más sustituyentes no amínicos o no comprende ningún sustituyente adicional, y/o en donde el compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico es una betaína, que es opcionalmente N,N,N-trimetilglicina.
9. El uso según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde el grupo carboxilo del compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico tiene un pKa en el intervalo de 1 a 4, tal como un pKa en el intervalo de 1,5 a 3,5.
10. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico está presente a una concentración de menos de 200 mM o menos de 100 mM o menos de 50 mM, y/o en donde el pH del tampón está en el intervalo de 2,3 a 3,5.
11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde, antes de la etapa en la que se pone en contacto el anticuerpo con la marca, reactivo de derivatización, marcador activado o reactivo de derivatización

activado, el anticuerpo se aísla mediante una etapa de elución del anticuerpo de una fase sólida según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, y en donde el sistema amortiguador comprende el tampón utilizado para la etapa de elución del anticuerpo.

- 5 12. Un kit de aislamiento de anticuerpos que comprende una matriz de afinidad en fase sólida para unir un anticuerpo y un tampón para eluir el anticuerpo cuando se une a la matriz de afinidad, en donde el tampón comprende un compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico distinto de glicina, que tiene un sustituyente amínico en la posición alfa o beta, en donde el pH del tampón está en el intervalo de 1,8 a 3,5, y en donde el tampón se define como en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.
- 10 13. Un kit de aislamiento de anticuerpos según la reivindicación 12, que comprende adicionalmente un tampón de neutralización como se define en la reivindicación 5 y opcionalmente un tampón de captura como se define en la reivindicación 5.
- 15 14. Un kit de aislamiento de anticuerpos según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde el pH del tampón de captura está en el intervalo de 6 a 8 y/o en donde el pH del tampón de neutralización está por encima de 6 o por encima de 8, o está en el intervalo de 8,5 a 11, o en el intervalo de 9 a 9,5.
- 20 15. La composición de anticuerpos para su uso en una reacción de conjugación, cuya composición comprende un anticuerpo aislado en un sistema amortiguador, en donde el sistema amortiguador comprende un compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico que porta un sustituyente de amonio cuaternario en la posición alfa o beta, en donde el compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico está presente a una concentración de menos de 200 mM y en donde el compuesto amortiguador de ácido monocarboxílico opcionalmente se define como en la reivindicación 9 o la reivindicación 10.
- 25 16. Una composición de anticuerpo según la reivindicación 15, en donde el sistema amortiguador comprende adicionalmente un compuesto amortiguador de neutralización como se define en la reivindicación 5 y opcionalmente un tampón de captura como se define en la reivindicación 5.
- 30 17. Una composición de anticuerpo según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, que tiene un pH en el intervalo de 5 a 9, y/o en donde el anticuerpo aislado se conjuga con una marca, tal como una marca que comprende una enzima, una proteína fluorescente, un colorante orgánico, una partícula coloreada, biotina, estreptavidina o un polímero.
- 35 18. Uso de un sistema amortiguador como se define en la reivindicación 16 como medio de almacenamiento para un anticuerpo o producto conjugado de anticuerpo.

Figura 1

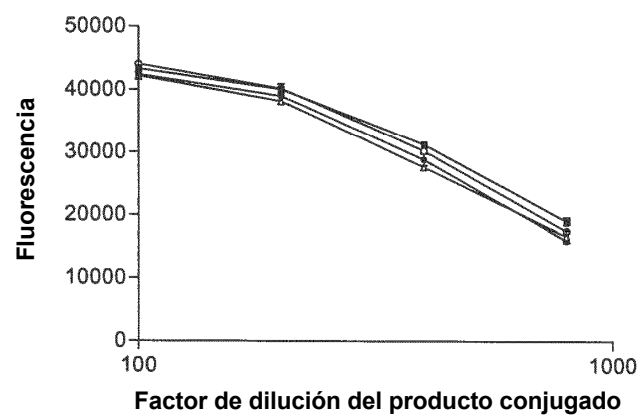


Figura 2

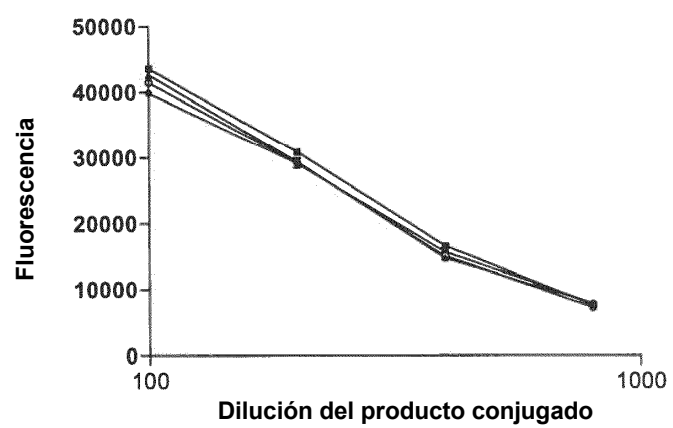


Figura 3

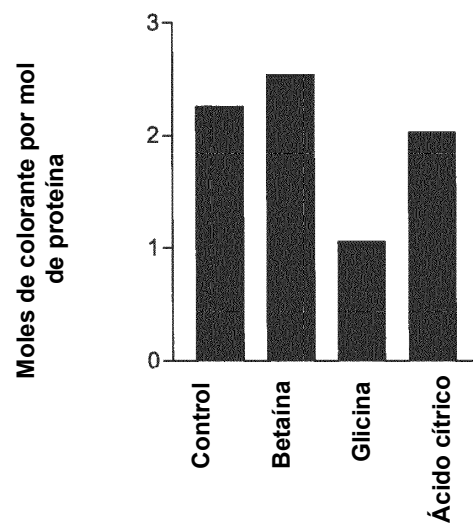


Figura 4

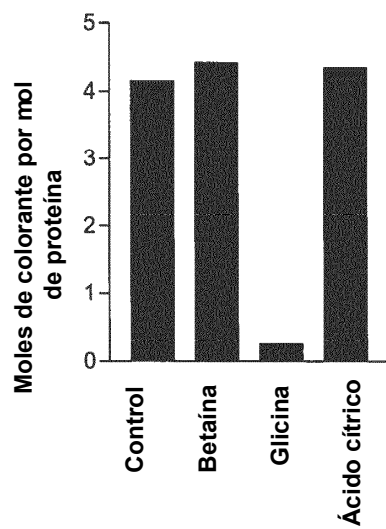


Figura 5

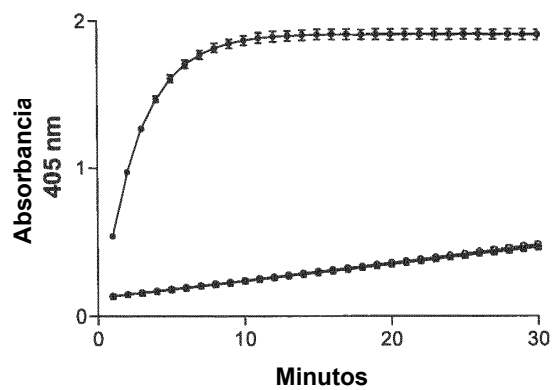


Figura 6

