

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 186**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 1/32 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2010 PCT/EP2010/056010**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.11.2010 WO10128033**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2010 E 10718161 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 2427482**

54 Título: **Método para la purificación de polipéptidos diana**

30 Prioridad:

07.05.2009 EP 09159710

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

17.07.2020

73 Titular/es:

**CHRETO APS (100.0%)
Lejrvej 17, 1.
3500 Værløse, DK**

72 Inventor/es:

**KYHSE-ANDERSEN, JAN y
WINTHER, LARS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 774 186 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

Método para la purificación de polipéptidos diana

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso para la purificación de una molécula diana, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una molécula diana y una población de polipéptidos de unión a la diana (TBP, por sus siglas en inglés), en solución durante un tiempo suficiente para permitir la formación de complejo; y (b) aislar la diana del complejo de (a) mediante etapas de purificación posteriores.

15 **Antecedentes de la invención**

La recuperación y purificación de proteínas terapéuticas representa aproximadamente el 75 % de los costes de fabricación de fármacos biológicos. Mejorar la eficiencia y/o reducir los costes en la etapa de purificación es de interés general. El proceso general de purificación industrial con frecuencia incluye varias etapas de operación unitaria, como extracción, precipitación, así como cromatografía de intercambio aniónico y catiónico. La cromatografía de afinidad es la etapa del proceso corriente abajo preferida debido a su recuperación, rendimiento y especificidad altos, pero el coste actual y las limitaciones de la cromatografía de afinidad son muy sustanciales y, en muchos casos, prohibitivos para un uso más general y eficiente de esta operación unitaria.

La cromatografía de afinidad convencional se caracteriza en general por tener un ligando de captura inmovilizado en una matriz de fase sólida. El ligando se une reversiblemente a una molécula diana presente en un fluido tal como medio de cultivo líquido o suero. Las moléculas diana se recuperan disociando el complejo en condiciones de elución. Las matrices de afinidad disponibles en el mercado están en un formato listo para usar que incluye capturar ligandos unidos de forma covalente a las matrices. En la cromatografía de afinidad convencional, la constante de disociación, K_D , entre el ligando y la proteína diana está en el intervalo de aproximadamente 10^{-5} - 10^{-7} M. Las interacciones con constantes de disociación que superan 10^{-10} - 10^{-11} M con frecuencia son imposibles de usar, ya que las condiciones necesarias para disociar el complejo son las mismas que las que darán como resultado la desnaturalización de las proteínas diana.

En la solicitud en trámite junto con la presente WO 2009062942, los inventores han demostrado anteriormente la viabilidad de aplicar un ligando de captura genérico inmovilizado en una matriz y un polipéptido de afinidad doble semigenérico con diferente afinidad de unión hacia la biomolécula diana y el ligando de captura respectivamente en un proceso de purificación. El polipéptido de afinidad doble (DAP, por sus siglas en inglés) reacciona con la biomolécula diana para formar un complejo 1:1 de afinidad de unión al medio en el que un DAP se une a una diana y este complejo posteriormente se une de forma no covalente a una matriz de afinidad genérica con una afinidad de unión fuerte. La molécula diana se recupera mediante elución específica de la matriz genérica, dejando el polipéptido de afinidad doble unido al ligando de captura sobre la matriz, debido a la unión fuerte al ligando que evita la fuga de la matriz de fase sólida.

Hilbrig et al. "Utilization of group specific ligands in the downstream processing of proteins by affinity precipitation" *FOOD AND BIOPRODUCTS PROCESSING*, INSTITUTION OF CHEMICAL ENGINEERS, RUGBY, Reino Unido, vol. 84, n.º 1, 1 de marzo de 2006 (03-01-2006), páginas 28-36, XP022525360, ISSN; 0960-3085, DOI: 10.1205/FBP.05153" desvela la creación de microligandos de afinidad mediante la unión de mediadores/ligandos de afinidad específicos a un polímero sensible al estímulo.

El objetivo de la presente invención es mejorar adicionalmente este sistema aumentando la capacidad de unión de la molécula de DAP.

50 **Sumario de la invención**

La invención proporciona un proceso mejorado para la purificación de una molécula diana usando un polipéptido de unión a la diana (TBP) que, igual que la molécula de DAP, tiene afinidades de unión doble; una frente a la molécula diana y otra frente a un soporte sólido. El TBP de la invención se ha mejorado superando el DAP en que el TBP es capaz de formar complejos de orden superior con la molécula diana dando como resultado una eficacia de unión mejorada.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para la purificación de una molécula diana, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una molécula diana y una población de polipéptidos de unión a la diana (TBP, por sus siglas en inglés), en solución durante un tiempo suficiente para permitir la formación de complejo; y (b) aislar la diana del complejo de (a) mediante etapas de purificación posteriores, en donde el aislamiento de la diana del complejo se obtiene capturando los complejos diana-TBP sobre un soporte, seguido de la elución de la molécula diana del soporte, mientras que el TBP permanece inmovilizado al soporte, en donde (I) los polipéptidos de unión a la diana tienen al menos dos funcionalidades de unión; una primera funcionalidad de unión hacia la diana y una segunda funcionalidad de unión hacia un ligando de captura comprendido en un soporte sólido;

y (ii) la primera funcionalidad de unión comprende al menos dos sitios de unión para la diana y la diana comprende al menos dos sitios de unión para el TBP en donde la molécula diana es una biomolécula, y en donde dicha biomolécula es una proteína, péptido, oligopéptido, lipoproteína, apolipoproteína, proteína de fósforo o glucoproteína.

- 5 En un segundo aspecto, la presente invención desvela el uso de un ensayo capaz de medir la formación de complejo para la optimización de la capacidad de unión de una combinación TBP-diana específica.

En un tercer aspecto, la presente invención desvela un TBP para la purificación de una molécula diana, en donde (i) el polipéptido de unión a la diana tiene al menos dos funcionalidades de unión; una primera funcionalidad de unión hacia la diana y una segunda funcionalidad de unión hacia un ligando de captura comprendido en un soporte; y (ii) la primera funcionalidad de unión comprende al menos dos sitios de unión para la diana.

En un cuarto aspecto, la presente invención desvela un kit para la optimización de la formación de complejo que comprende un TBP adecuado y material de soporte para retirar el TBP.

15 En un quinto aspecto, la presente invención desvela un método para seleccionar un TBP adecuado para la formación de complejo con un polipéptido diana de interés que comprende: (a) poner en contacto TBP individuales obtenibles de una biblioteca de TBP con la diana de interés y (b) determinar la formación de complejo.

20 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una tabla que resume los conjugados preparados con respecto a las concentraciones, la estequiometría, el tiempo de reacción y el grado medido de sustitución de SPDP por Proteína

25 Columna A: Concentración de Proteína A durante la activación de SPDP en mg/ml
 Columna B: SPDP equivalente por Proteína A
 Columna C: Grado de sustitución de SPDP por Proteína A
 Columna D: Concentración de avidina durante la activación de SMCC en mg/ml
 Columna E: SMCC equivalente por Avidina
 30 Columna F: Relación molar entre Proteína A y Avidina durante la interconjugación
 Columna G: Concentración de Proteína A durante la interconjugación en mg/ml
 Columna H: Tiempo de reacción de interconjugación en minutos.

35 La Figura 2 muestra la curva de respuesta a la dosis del ensayo de turbidimetría que muestra la absorbancia a 340 nm después de la sustracción del blanco frente a la concentración de IgG para los TBP en bruto antes de la purificación por cromatografía de exclusión por tamaño. Los TBP se diluyeron a aproximadamente 2,0 mg/ml.

40 La Figura 3 muestra la curva de respuesta a la dosis del ensayo de turbidimetría que muestra la absorbancia a 340 nm frente a la concentración de IgG para cuatro TBP después de la purificación por cromatografía superdex 75. Los conjugados, 3, 11, 12 y 17 se recogieron como picos de volumen vacío de purificaciones por cromatografía superdex 75. Los TBP n.º 3, 11 y 17 eran la mezcla de dos agrupaciones de volumen vacío. Los TBP se diluyeron a aproximadamente 1,0 mg/ml.

45 La Figura 4 muestra la curva de respuesta a la dosis del ensayo de turbidimetría que muestra la absorbancia a 340 nm después de la sustracción del blanco y después de 30 segundos y 10 minutos, frente a la concentración de IgG para TBP n.º 18 preparado mediante el método SATA/sulfoSPDP y diluido a aproximadamente 1,0 mg/ml.

50 La Figura 5 muestra la curva de respuesta a la dosis del ensayo de turbidimetría usando el tampón patrón que muestra la absorbancia frente al tiempo para IgG diana 5,71; 3,33; 1,48; 0,077 mg/ml, TBP y blanco de tampón, respectivamente.

55 La Figura 6 muestra la curva de respuesta a la dosis del ensayo de turbidimetría usando el tampón de potenciación que muestra la absorbancia frente al tiempo para IgG diana 5,71; 3,33; 1,48; 0,077 mg/ml, TBP y blanco de tampón, respectivamente.

La Figura 7 muestra la curva de dosis-respuesta del ensayo de turbidimetría que muestra la absorbancia a 340 nm frente a las concentraciones diana crecientes registradas después de 10 minutos usando (a) el tampón patrón HEPES/NaCl pH 7,0 o (b) un tampón que contiene PEG.

60 La Figura 8 muestra un diagrama de bloques que compara las áreas de pico de IgG de elución de (a) complejo TBP-Diana formado en solución y unido a la columna y (b) de la captura y la elución repetida de IgG del TBP inmovilizado en la columna antes de la captura de IgG.

65 Descripción detallada de la invención

En la cromatografía de afinidad convencional para la purificación de, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, el

ligando de captura (Proteína A) se fija a una matriz de fase sólida y tiene la afinidad hacia la biomolécula diana (anticuerpos monoclonales). La tecnología de DAP descrita anteriormente en el documento WO 2009062942 proporciona ventajas en comparación con las tecnologías de purificación por afinidad convencionales para la industria de procesamiento corriente abajo debido a los costes menores, la capacidad alta y la facilidad de uso sin comprometer la calidad del proceso corriente abajo. Una característica esencial de la tecnología de DAP es el uso de un polipéptido de afinidad doble como enlazador entre la molécula diana y el soporte sólido que comprende un ligando. Estos polipéptidos de afinidad doble son particularmente útiles para el procesamiento corriente abajo de proteínas y péptidos biofarmacéuticos y de diagnóstico. Para que esta técnica sea una alternativa competitiva a la cromatografía de afinidad convencional, es muy importante que se optimice la capacidad de unión de la molécula diana al polipéptido de afinidad doble (DAP). La presente invención se refiere a esta optimización y describe qué parámetros pueden ajustarse ventajosamente con el fin de optimizar dicha capacidad de unión. A continuación, se usará el término polipéptido de unión a la diana (TBP) en lugar del término DAP.

Los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que cuando la molécula de TBP se une a la molécula diana en determinadas condiciones, es posible formar complejos de orden superior que aumentan en gran medida la capacidad de unión del TBP. La formación de estos complejos conduce a un cambio en la densidad óptica de la solución y puede medirse convenientemente mediante espectrofotometría. Se ha descubierto adicionalmente que dicha formación de complejo puede promoverse proporcionando determinadas propiedades de unión mínimas al TBP, así como optimizando la relación entre el TBP y la diana, así como las condiciones de unión.

Como resultado de la formación de complejo entre el TBP y la diana, esto facilita la aplicación de muchas etapas de purificación convencionales posteriores como la centrifugación y la precipitación que han de aplicarse en la purificación de la diana, retirando de este modo varias de las restricciones en los procesos de purificación actuales.

De acuerdo con la invención, las propiedades estructurales mínimas de los TBP que son necesarias con el fin de dar como resultado la formación de complejos de orden superior requiere que los TBP comprendan al menos dos sitios de unión para la diana y que la diana comprenda al menos dos sitios de unión para el TBP. Además, es necesario que el TBP tenga al menos dos funcionalidades de unión; una hacia la diana y una hacia un ligando de captura comprendido en un soporte, puesto que con el fin de aislar con el tiempo la molécula diana, es necesario retirar el TBP mediante la fijación a un soporte. Por tanto, un aspecto de la invención se refiere a un TBP para la purificación de una molécula diana, en donde (i) el polipéptido de unión a la diana tiene al menos dos funcionalidades de unión; una primera funcionalidad de unión hacia la diana y una segunda funcionalidad de unión hacia un ligando de captura comprendido en un soporte; y (ii) la primera funcionalidad de unión comprende al menos dos sitios de unión para la diana.

Un aspecto principal de la invención se refiere a un proceso para la purificación de una molécula diana, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una molécula diana y una población de polipéptidos de unión a la diana (TBP, por sus siglas en inglés), en solución durante un tiempo suficiente para permitir la formación de complejo; y (b) aislar la diana del complejo (a) mediante etapas de purificación posteriores en donde (i) los polipéptidos de unión a la diana tienen al menos dos funcionalidades de unión; una primera funcionalidad de unión hacia la diana y una segunda funcionalidad de unión hacia un ligando de captura comprendido en un soporte; y (ii) la primera funcionalidad de unión comprende al menos dos sitios de unión para la diana, y la diana comprende al menos dos sitios de unión para el TBP.

En una realización adicional, los TBP comprenden al menos tres sitios de unión para la diana y/o la diana comprende al menos tres sitios de unión para los TBP. Esta característica permite la formación de redes complejas que conducen a un aumento en la capacidad de unión del TBP y la diana.

La población de polipéptidos de unión a la diana puede en una realización contener solo TBP idénticos y en otra realización puede comprender TBP que sean estructural y/o funcionalmente diferentes. En otras palabras, los TBP pueden en la última realización ser una población de TBP donde, por ejemplo, el número de sitios de unión a la diana en cada TBP varía dentro de la población y/o los sitios de reconocimiento específicos para cada sitio de unión pueden ser diferentes, es decir, los sitios de unión en el TBP reconocen sitios posicionados de manera diferente en la diana.

El complemento formado de acuerdo con la invención debe distinguirse de la forma de complejo más simple que será resultado de la unión de una molécula diana a un TBP. El complejo formado de acuerdo con la invención debe comprenderse como un complejo de orden superior entre la molécula diana y el polipéptido de unión a la diana (TBP) que se forma en un proceso reversible, dando como resultado la formación de una red tridimensional en la que se forman y se rompen enlaces dinámicamente entre los componentes. Idealmente, la red se forma por más de un punto de unión por componente. Puede tomar algún tiempo antes de que se obtenga el equilibrio entre los componentes de complejo y libres en solución y también internamente en el complejo. El complejo resultante puede permanecer en solución o puede precipitar. El complejo formado tendrá un peso molecular significativamente mayor que los componentes individuales y, en consecuencia, tendrá propiedades de solubilidad modificadas, en donde el aislamiento de la diana del complejo se obtiene capturando los complejos diana-TBP sobre un soporte, seguido de la elución de la molécula diana del soporte mientras el TBP permanece inmovilizado en el soporte, en donde la

molécula diana es una biomolécula y en donde dicha biomolécula es una proteína, péptido, oligopéptido, lipoproteína, apolipoproteína, proteína de fósforo o glucoproteína.

5 Adicionalmente, debe quedar claro que para el complejo formado de acuerdo con la invención, la fuerza de unión entre la molécula diana y el TBP debe ser suficientemente débil para ser prácticamente reversible con el fin de recuperar la molécula diana inalterada después de las etapas de separación posteriores. Para más detalles véase la descripción a continuación.

10 Los complejos formados de acuerdo con la invención pueden determinarse convenientemente mediante ensayos capaces de determinar cambios en la densidad óptica o la dispersión de luz. Las formaciones de complejos de proteína y otras biomoléculas pueden controlarse mediante dispersión de luz. Los complejos actúan como pequeñas o esferas partículas en solución. La interacción entre la radiación electromagnética en forma de luz y el dipolo eléctrico inducido en partículas esféricas puede provocar dispersión, que se describe en general en la teoría de Lorenz-Mie-Debye. La turbidimetría y la nefelometría son métodos de medición convenientes y prácticos para
15 controlar la dispersión de luz de muestras en una célula de medición.

En la turbidimetría, el detector de luz se alinea con la célula de medición y la fuente de luz. El detector responde a la disminución de la intensidad de la luz incidente provocada por la dispersión en la célula de medición. Los datos de salida son análogos a las mediciones de absorción tradicionales. La única diferencia es el fenómeno de dispersión de luz que provoca la disminución de la intensidad de la luz. La disminución de la intensidad se relaciona con la concentración y la naturaleza de las esferas de dispersión en la célula de medición a una longitud de onda constante.
20

En la nefelometría, el detector de luz no se alinea con la fuente de luz y mide la luz dispersada, en lugar de la disminución en la intensidad de la radiación incidente como en la turbidimetría.
25

Debe comprenderse que la intensidad de la luz dispersada depende de múltiples factores, incluyendo la longitud de onda de la luz incidente, el ángulo desde donde se coloca el detector y el tamaño, el grado de solvatación, la densidad, la concentración y el índice de refracción de la esfera en solución. Además, si la esfera o complejo precipita en la solución debido al tamaño y la densidad crecientes, la señal de turbidimetría puede cambiar a medida que se disperse menos luz a pesar de la presencia del complejo formado.
30

El turbidímetro automatizado, el nefelómetro y los instrumentos combinados se usan ampliamente para cuantificar complejos de proteínas en inmunoensayos; en particular, complejos entre antígeno y anticuerpos o partículas de látex unidas a anticuerpos.
35

Otros métodos para medir la formación de complejos incluyen, por ejemplo, observar el cambio visual en la turbidez contra una superficie oscura, diversos métodos de dispersión Raman o Rayleigh, estudios de microscopía electrónica y óptica de campo cercano, aislar y medir el peso del complejo, centrifugación en gradiente, velocidad de difusión sobre o a través de geles y membranas o medir la reflexión de ondas ultrasónicas u otras ondas acústicas.
40

Los presentes inventores se han dado cuenta de que la formación del complejo entre TBP y la molécula diana durante el proceso de purificación puede controlarse fácilmente mediante turbidimetría. En una realización particular, la formación de complejo es equivalente a un cambio en la densidad óptica de al menos 0,1 cuando se mide mediante turbidimetría en una solución cuando la diana y el TPB se mezclan y se dejan reaccionar. En una realización particular, el tiempo de reacción y la temperatura están entre 1 y 20 min a 25 °C, más particularmente entre 2 y 12 min a 25 °C. Debe comprenderse que el tiempo de reacción debe ser suficiente para que se formen complejos, pero también son posibles tiempos de reacción más largos.
45

Los inventores de la presente invención han descubierto que el rendimiento y la calidad de la purificación de la molécula diana dependen de la magnitud de la formación de complejo inicial y de la relación entre la diana y el TBP. El ensayo de turbidimetría anterior puede usarse para optimizar la relación de inicio entre TBP y la diana con el fin de maximizar la formación de complejo, por ejemplo, realizando un experimento de respuesta a la dosis simple. Esto es importante, ya que la concentración de la diana puede no conocerse de antemano. Adicionalmente, la optimización del proceso de purificación puede realizarse basándose en una medición simple antes y/o durante el proceso de purificación monitorizando y controlando la relación al nivel óptimo.
50
55

Por tanto, en una realización particular de la invención, la relación de polipéptido diana a TBP se optimiza para permitir la formación de complejo óptima. En particular, el proceso de acuerdo con la invención se optimiza midiendo la formación de complejo. Por tanto, un aspecto de la invención desvela un uso de un ensayo capaz de medir la formación de complejo para la optimización de la capacidad de unión de una combinación específica de TBP-diana.
60

Dicha medición se realiza en una realización mediante ensayos espectrofotométricos. Dichos ensayos incluyen preferentemente turbidimetría y nefelometría. En una realización adicional, la relación de blanco a TBP se monitoriza y se controla durante la etapa de formación de complejo. En una realización adicional más, la relación de diana a TBP se controla antes, durante y después de la etapa de formación de complejo.
65

Preferentemente, la recuperación de la diana se optimiza midiendo la cantidad de complejo TBP-Diana formado, separado y disuelto.

5 La medición puede realizarse directamente en el lugar durante el proceso o basándose en las muestras extraídas. Se prefiere un mecanismo o instrucción de retroalimentación corrector u optimizador.

Se prefieren aún más los mecanismos de retroalimentación automáticos que, basados en el cambio de turbidez antes y después de mezclar la diana y el TBP, pueden controlar la formación de los complejos de la invención.

10 La molécula de TBP también puede detectarse y controlarse directamente usando proteínas de unión específicas o métodos físicos en el lugar o en un ensayo separado, por ejemplo, ELISA. Puede ser especialmente importante detectar cualquier traza de TBP en la diana recogida y purificada. Además, el TBP puede comprender un marcador que puede detectarse directamente en línea o fuera de línea en cualquier punto del proceso de flujo de trabajo de purificación. El marcador puede detectarse mediante métodos de espectrofotometría o más preferentemente puede detectarse mediante fluorescencia o espectrofotometría UV/VIS. Los marcadores fluorescentes que pueden incorporarse como proteínas de fusión en TBP expresados de forma recombinante son de relevancia especial.

15 Los marcadores fluorescentes preferidos incluyen proteína verde fluorescente (GFP), proteína fluorescente cian, rojo KFP, PS-CFP, PS-CFP2, HcRed1, DsRed, Luciferasa u otras proteínas de fusión fluorescentes o luminiscentes o marcadores fluorescentes indirectamente, como el HaloTag.

20 El gráfico de dosis-respuesta es la base de numerosos inmunoensayos, incluyendo ensayos de turbidimetría. Una curva típica de dosis-respuesta es un gráfico X-Y que relaciona la concentración de la molécula diana con la respuesta del TBP. La respuesta puede medirse físicamente. De particular relevancia para la presente invención, la respuesta es un cambio en la turbidimetría debido a la dispersión de la luz. El experto en la materia sabe cómo estudiar y optimizar ensayos. Numerosos libros proporcionan orientación, incluyendo *Immunoassay*, Eleftherios P. Diamandis, Theodore K. Christopoulos, Academic Press, 1996).

25 La naturaleza y la forma de la curva de dosis-respuesta es el resultado de la reacción específica entre la molécula diana y el TBP y la ley de acción de masas. Para una concentración particular de TBP, el cambio en la absorbancia o turbidez (eje Y) puede dibujarse frente a la concentración de molécula diana (eje x). La curva de respuesta a la dosis resultante es normalmente en forma de campana o sigmoidea. Con una concentración diana baja, la turbidez es baja, ya que el TBP está en un gran exceso y no pueden formarse complejos. En el punto más alto, el punto de equivalencia aparente, la relación entre dianas y TBP, da como resultado la dispersión de complejo más grande. Más allá del punto de equivalencia, la turbidez disminuye, ya que la molécula diana está en exceso, inclinando el equilibrio para la formación óptima de complejos. El comportamiento de respuesta a la dosis también ilustra la naturaleza dinámica de la formación de complejo.

30 Un cambio en la relación diana - a - TBP dará como resultado una nueva distribución de complejo y turbidez en la nueva situación de equilibrio.

35 De acuerdo con una realización ventajosa adicional de la presente invención, el reconocimiento específico y la unión de la molécula diana pueden controlarse y optimizarse en solución, al contrario que los sistemas de purificación por afinidad basados en columnas convencionales.

La optimización de la relación de TBP - a - diana también es importante por razones de coste y mejor diseño dimensional, ya que el TBP no ha de reciclarse y, por tanto, es un reactivo de un solo uso.

40 Además de la relación de diana a TBP como se ha analizado anteriormente, se ha descubierto que las condiciones de reacción presentes durante la formación de complejo también influirán en la formación de complejo. En particular, se ha descubierto que determinados tampones promueven dicha formación de complejo.

45 Los sistemas de tampón adecuados para aumentar, por ejemplo, la formación de complejo anticuerpo-antígeno específico se conoce a partir de inmunoensayos como ensayos de turbidimetría, nefelometría y aglutinación.

Los tampones adecuados para aumentar la formación de complejo de acuerdo con la invención incluyen reactivos para i) reducir la actividad del agua, ii) estabilizar el pH y iii) evitar interacciones y precipitaciones de proteínas inespecíficas o aleatorias y aumentar la solubilidad proteínica general.

50 Más específicamente, los componentes reductores de la actividad del agua pueden tomarse de la familia de sales de bajo peso molecular, poliazúcares, polialcoholes y otros polímeros.

55 En una realización particular, los reactivos para reducir la actividad del agua comprenden sulfato de amonio, ácido caprílico, dextrano, polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), ácido hialurónico, quitosano y sus ésteres, polioles globulares como ficoll y polivinilpirrolidona (PVP).

Más particularmente, los reactivos para reducir la actividad del agua incluyen PEG al 1-10 % (p/v) con un peso molecular promedio de 1.000 a 10.000 Da.

- 5 Los reactivos adecuados para reducir las interacciones proteínicas inespecíficas incluyen detergentes o tensioactivos neutros, aniónicos, catiónicos y de copolímero de bloque.

En particular, los tensioactivos se seleccionan entre el grupo que consiste en Tween 20, Tween 40, la familia de los plurónicos y detergentes NP40 en concentraciones inferiores al 2 %.

- 10 Los reactivos estabilizadores del pH incluyen tampones de fosfato, citrato, borato, además de tampones Good.

En particular, se prefieren sistemas de tampón de pH basados en fosfatos, por ejemplo, Tris, MES y Hepes, a pH 5-8.

- 15 Debe quedar claro que un tampón adecuado puede contener solo uno o múltiples reactivos con las propiedades generales anteriores.

- 20 Además de la etapa de formación de complejo descrita anteriormente, el proceso de purificación de acuerdo con la invención requiere etapas adicionales. Aunque el experto puede no haber tenido en cuenta el orden de las etapas antes o incluso la aplicación o combinación de dicha etapa adicional para purificar una molécula diana, el experto conoce bien las etapas como tales.

- 25 En el proceso de acuerdo con la invención, la molécula diana es una biomolécula. Las biomoléculas comprenden proteínas, péptidos, oligopéptidos, lipoproteínas, apolipoproteínas, fosfoproteínas y glucoproteínas.

- 30 Las moléculas diana que también se desvelan también incluyen oligosacáridos, polisacáridos, lignina, lípidos que incluyen ácidos grasos, glucolípidos, fosfolípidos y esteroides, hidratos de carbono, nucleótidos incluyendo ácido desoxirribonucleico y ácido ribonucleico, vitaminas, células completas y fracciones de las mismas, y partículas de virus y fracciones de los mismos.

- 35 Las moléculas diana que se desvelan incluyen adicionalmente moléculas sintéticas, precursores de síntesis orgánica, productos de síntesis orgánica, moléculas de extractos naturales y minerales naturales, incluyendo minerales de tierras raras.

- Otras dianas de interés comprenden isómeros específicos, por ejemplo, enantiómeros, de mezclas de estereoisómeros que surgen de fuentes naturales o sintéticas.

- 40 En una realización más particular, las biomoléculas incluyen proteínas adecuadas para su uso terapéutico y fabricadas en sistemas celulares y, en particular, anticuerpos.

- 45 Una etapa clave en el proceso de purificación de la invención es la separación del complejo de TBP-molécula diana de otros componentes y la reducción del volumen de líquido del proceso. Dos métodos son particularmente relevantes i) separación física o ii) unión del complejo a un material de soporte.

- Los sistemas de separación se usan ampliamente en procesamiento farmacéutico y químico, procesamiento de alimentos y bebidas y tratamiento de aguas residuales.

- 50 La separación física del complejo puede realizarse, por ejemplo, mediante sedimentación por gravitación simple, centrifugación discontinua, ultracentrifugación usando una fuerza centrífuga muy alta, centrifugación continua, filtración simple, filtración forzada o filtración de flujo cruzado en fibra hueca o sistemas de membrana.

- 55 El complejo de la innovación puede separarse en forma de sólidos, en forma de suspensiones húmedas, en forma de pasta o en forma de una solución enriquecida de complejo.

- Las centrifugadoras son particularmente relevantes para un proceso de separación de la invención, ya que la operación unitaria es simple, fácilmente escalable, robusta, generalmente usa una huella pequeña y, opcionalmente, puede funcionar de forma continua.

- 60 El tipo óptimo de centrifugadoras depende del volumen de muestra específico, la viscosidad, la densidad, la distribución de tamaño del complejo, la concentración y el caudal necesarios.

- 65 Las centrifugadoras discontinuas incluyen diseños con cubos oscilantes, ángulos fijos o rotores verticales. El proceso de centrifugación puede disponerse como una centrifugación diferencial simple o un gradiente de densidad más complejo, una centrifugación zonal o isopícnica que puede separar basándose en la flotabilidad y la velocidad de sedimentación.

5 Las centrifugas continuas son bien conocidas, incluyendo las centrifugas o decantadores de cubeta sólida y las centrifugas de cubeta de disco. La forma más simple de centrifugadoras continuas consiste en una cubeta que gira alrededor de un eje vertical. Las muestras se introducen en esta y, con la fuerza centrífuga, el líquido o los sólidos más pesados pasan a las regiones más externas de la cubeta, mientras que los componentes más ligeros se mueven hacia el centro. Las tuberías de recolección y las placas cónicas internas se disponen para proporcionar una separación eficiente.

10 Otros diseños optimizados para separar líquidos y sólidos incluyen centrifugadoras con cubeta telescópica y cubeta horizontal con descarga de desplazamiento. Esta última se diseña para descargar de forma continua los sólidos o la suspensión acumulados y separados. Centrifugadoras similares, como centrifugas de cesta perforada y centrifugadoras de cesta no perforada, pueden funcionar casi de forma continua para recoger los sólidos o la suspensión.

15 Otras operaciones unitarias relevantes para la separación del complejo TBP-diana son sedimentación, flotación y filtración.

20 El complejo puede separarse mediante sedimentación simple o más preferentemente en un proceso de sedimentación continua.

25 Más detalladamente, el equipo de sedimentación continua para la separación de partículas sólidas de líquidos por sedimentación gravitacional se diseña para proporcionar tiempo suficiente para que se produzca la sedimentación y para permitir que se retire el desbordamiento y el sedimento sin alterar la separación. Generalmente se desea un flujo continuo a través del equipo, se usan recipientes de diversas formas, con una sección transversal suficiente para mantener las velocidades bajas y equipados con rascadores de movimiento lento, transportadores y bombas para retirar los sólidos sedimentados.

30 Se conocen múltiples diseños de espesantes continuos, que equilibran la velocidad de sedimentación en una zona particular con la velocidad de contraflujo de los fluidos ascendentes para separar o enriquecer sólidos o suspensiones.

Los instrumentos de filtración para separar y recoger principalmente grandes cantidades de sólidos en forma de una torta de filtro acumulada incluyen la prensa de placa y marco y diversas prensas rotativas.

35 En lugar de sedimentar sólidos o partículas, estos pueden flotar a la superficie mediante el uso de burbujas de aire. Esta técnica con frecuencia se conoce como flotación y depende de la tendencia relativa del aire y el agua a adherirse a la superficie de la partícula. El agua en la superficie de la partícula es desplazada por el aire, después de lo cual la flotabilidad del aire es suficiente para transportar tanto la partícula como la burbuja de aire a través del líquido.

40 Los filtros centrífugos son combinaciones convenientes de las centrifugadoras mencionadas anteriormente combinadas con un filtro semipermeable adecuado. Otras filtraciones forzadas usan líquidos presurizados o vacío para acelerar el proceso de filtrado.

45 Los filtros y las membranas pueden usarse como operaciones unitarias eficientes para separar el complejo TBP-diana formado de acuerdo con la invención. El filtro o membrana es semipermeable y retendrá las partículas según el tamaño y permitirá que pasen los líquidos y las partículas de menor tamaño. Algunas membranas se separarán dependiendo de otras propiedades físicas, incluyendo la carga o la hidrofilia.

50 La filtración discontinua simple es bien conocida y el filtro se dispone en embudos y columnas y se acelera mediante presión y/o vacío.

55 El flujo cruzado, la fibra hueca y los sistemas de diálisis similares son de especial relevancia para la separación del complejo formado de acuerdo con la invención. En estos procesos de filtración forzada, los sólidos se retiran de forma continua de la superficie de la membrana para evitar la obstrucción y la acumulación de una torta de filtro.

60 El sistema de membrana puede ser una construcción cilíndrica dispuesta en láminas estacadas o como fibras huecas agrupadas. En una disposición particularmente preferida, el flujo cruzado o el sistema de fibra hueca se alimenta con la mezcla compleja y un tampón y se usa para retirar contaminantes, lavar y concentrar el complejo en un modo continuo.

65 Debe quedar claro que las operaciones unitarias mencionadas anteriormente también se prefieren para recoger y lavar los soportes unidos al complejo TBP-diana y para la concentración general o cambio de tampones durante el proceso de purificación.

Otra operación unitaria importante para la presente invención es la separación del complejo de molécula de TBP-

diana mediante la unión a un soporte. El soporte normalmente será un material insoluble sólido u otro material fácilmente recogible con capacidad de unión frente a una de las funcionalidades de unión en el TBP.

5 Los pares de unión atractivos incluyen aquellos en los que el ligando inmovilizado es una molécula pequeña y especialmente ligandos que están fácilmente disponibles, sintéticos o resistentes a la degradación microbológica. Los ejemplos incluyen biotina que puede acoplarse fácilmente de forma covalente a muchos soportes y es químicamente robusta.

10 En una realización, el aislamiento de la diana de los complejos se obtiene capturando primero los complejos diana-TBP sobre un soporte, seguido de elución y recogida de la molécula diana del soporte.

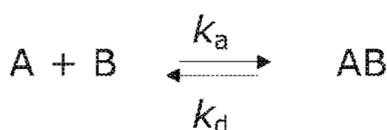
15 La molécula de TBP-diana forma complejos de afinidad de unión media y el complejo se une de forma no covalente a una matriz de afinidad genérica con una afinidad de unión fuerte. La biomolécula diana se recupera mediante elución específica del soporte, normalmente una matriz genérica, dejando el TBP fijado al ligando de captura sobre la matriz, debido a una unión estrecha al ligando que evita la fuga de la matriz de fase sólida.

20 El TBP actúa como el compañero de unión entre el soporte y la molécula diana. En una realización particular, la afinidad del TBP hacia el ligando inmovilizado es más fuerte que la afinidad hacia la molécula diana. Esta diferencia en la afinidad de unión puede expresarse como la relación entre las constantes de disociación en equilibrio. En una realización, la presente relación es al menos 1 en condiciones convencionales. Más preferentemente, la unión de TBP a la diana es más débil que la unión de TBP al ligando. Esto garantiza que el TBP permanezca unido a la fase sólida durante las etapas de lavado y la elución de la molécula diana. La relación anterior entre las constantes de disociación en equilibrio puede obtenerse variando las constantes de disociación en equilibrio respectivas del TBP en consecuencia. En una realización de la invención, el TBP tiene una constante de disociación en equilibrio hacia una molécula diana, $K_{D,t}$ en el intervalo de 10^{-2} a 10^{-13} M, por ejemplo, 10^{-9} M y una constante de disociación en equilibrio hacia un ligando de captura, $K_{D,s}$ en el intervalo de 10^{-9} a 10^{-16} M, por ejemplo, 10^{-10} M y, al mismo tiempo, la relación, $K_{D,t}/K_{D,s}$, debe coincidir de manera que la relación sea al menos 10^0 , más particularmente al menos 10^1 , más particularmente 10^2 , más particularmente 10^3 e incluso más particularmente 10^4 .

30 Particularmente, dicho TBP tiene una constante de disociación en equilibrio, $K_{D,t}$ hacia la molécula diana en el intervalo de 10^{-4} a 10^{-13} M, más particularmente en el intervalo de 10^{-6} a 10^{-13} M y una constante de disociación en equilibrio, $K_{D,s}$ hacia el ligando de captura en el intervalo de 10^{-9} a 10^{-16} M, más particularmente en el intervalo 10^{-11} a 10^{-16} M.

35 En general, la unión hacia el ligando o la columna debe ser lo más fuerte posible. Por tanto, el valor en el extremo superior del intervalo no es importante con respecto a $K_{D,s}$.

40 En el contexto de la presente invención, la constante de disociación en equilibrio se mide de acuerdo con la reacción:



45 A y B representan los compañeros de unión: la molécula diana y el TBP o, como alternativa, el TBP y el ligando de captura inmovilizado sobre la matriz de fase sólida.

Las constantes de velocidad para la reacción anterior representan la velocidad a la que las dos moléculas A y B se asocian y disocian.

Velocidad de disociación $\frac{d[AB]}{dt} = k_d [AB]$

50 **Velocidad de asociación:** $\frac{d[AB]}{dt} = k_a [A][B]$

Cuando las velocidades son iguales en equilibrio $k_a[A][B] = k_d [AB]$, que proporciona

$$\frac{k_d}{k_a} = \frac{[A][B]}{[AB]} = K_D$$

55

$$\frac{k_a}{k_d} = \frac{[AB]}{[A][B]} = K_A$$

- 5 Los dominios de unión candidatos que han de emplearse en el TBP deben evaluarse de acuerdo con las constantes de disociación en equilibrio aparente basadas en la afinidad de unión total de cada una de las funcionalidades de unión en una molécula de TBP dada independientemente de si contiene uno o varios sitios de unión para cada especificidad (diana/ligando de captura). Si, por ejemplo, A y B representan la Proteína A (tiene de cuatro a cinco dominios de unión) y avidina (que tiene cuatro sitios de unión) respectivamente, los intervalos anteriores deben aplicarse para una molécula de Proteína A fusionada con una molécula de avidina. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que, por ejemplo, la molécula de TBP pueda estar compuesta de varios sitios de unión para la diana y varios sitios de unión para el ligando sobre la matriz. El TBP podría, por ejemplo, en otra realización, consistir en 3 moléculas de Proteína A unidas a una o más moléculas de avidina. Por tanto, los intervalos especificados como se han definido anteriormente deberían evaluarse en el contexto de la presente invención basándose en las constantes de unión aparentes para los dominios de unión en común.
- 10
- 15 En el contexto de la presente invención, las constantes de disociación en equilibrio especificadas pueden determinarse mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (RPS) usando un instrumento Biacore. Como punto de partida adecuado para seleccionar diferentes dominios de unión que han de combinarse en la molécula de TBP, pueden usarse K_D publicadas.
- 20 Los dos pares de unión, denominados en la presente solicitud como una primera y una segunda funcionalidad de unión, deben seleccionarse basándose en las K_D durante condiciones de unión específicas, pero también teniendo en cuenta las condiciones de elución planificadas, cuando la diana se recupera y la molécula de TBP permanece sobre el soporte.
- 25 Como se ha descrito anteriormente, la determinación de las afinidades de disociación de diversos dominios de unión en el contexto de una molécula de TBP se consigue usando resonancia de plasmón superficial (RPS). Dicha evaluación puede hacerse con el sistema Biacore. Biacore tiene instrumentación comercial donde las mediciones basadas en RPS hacen determinaciones sobre interacciones proteína-proteína. La evaluación se realizó con un TBP o una molécula diana inmovilizada sobre el chip sensor utilizado en el instrumento Biacore. El sistema Biacore define las características de las proteínas en términos de su especificidad de interacción con otras moléculas, las velocidades a las que interactúan (asociación y disociación) y su afinidad (qué tan fuertemente se unen a otra molécula). Esta técnica se ha descrito, por ejemplo, para determinar las interacciones de unión entre anticuerpos específicos y su diana (véase, por ejemplo, Rönnmark, 2002, *Eur. J. Biochem.*, 269: 2647-2655).
- 30
- 35 La medición cuantitativa de las interacciones proteína-ligando no covalentes es bien conocida. Los métodos adecuados para la medición cuantitativa de constantes de unión de particular relevancia para la presente invención incluyen diversas versiones de resonancia de plasmón superficial (RPS) y dicroísmo circular (DC).
- 40 Otros métodos incluyen métodos de espectrometría de masas para titulaciones dinámicas como titulación IEN-EM, titulación HPLC-IEN-EM o titulación MALDI-SUPREX.
- Otros métodos se basan en la determinación de la constante de disociación de un ligando en un sitio de unión indirectamente mediante desplazamiento competitivo de un ligando radiactivo o mediante medición de desplazamiento químico por RMN como función de la concentración, el análisis de espectroscopia de fluorescencia de, por ejemplo, inactivación de señal, medición cristalográfica por rayos X de la ocupación del ligando, calorimetría isotérmica (CIT) o inhibición enzimática.
- 45
- Sin embargo, otros métodos usan ligandos marcados, por ejemplo, electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser de ligandos marcados con enzimas.
- 50 Como alternativa, pueden encontrarse constantes de enlace a partir de técnicas computacionales mediante el uso de diseño de novo, minería de datos y algoritmos sofisticados.
- En el contexto de la presente invención, los intervalos apropiados para las constantes de disociación en equilibrio deberían aplicarse al TBP completo y no a las partes de unión individuales medidas por separado.
- 55
- Por otro lado, si un único dominio de unión candidato tiene una afinidad de unión más débil hacia la diana o ligando que la requerida de acuerdo con la presente invención, aún podría ser aplicable combinando varios de dichos dominios de unión candidatos en un TBP.
- 60
- Esto se debe al efecto de valencia. Es posible obtener una fuerza de unión aumentada debido a una ganancia de avidéz. Los dominios únicos con una baja afinidad intrínseca combinados en multímeros con frecuencia generan

efectos de avidéz que conducen a velocidades de disociación más lentas y afinidades funcionales aumentadas en más de 100 veces (MacKenzie, C.R. et al (1996), *Analysis by surface plasmon resonance of the influence of valence on the ligand binding affinities and kinetics of and anti carbohydrate antibody*. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 1527-1533). Es posible medir los efectos de las uniones monovalentes y bivalentes, pero a valencias de unión más altas la situación se vuelve tan compleja que es difícil distinguir entre las valencias de unión diferentes. Sin embargo, pueden obtenerse datos relativos y usarse en el contexto de la presente invención.

Debido a las diferencias que se describen en las constantes de disociación en equilibrio, la molécula diana puede eluirse eficientemente sin eluir el TBP. La elución puede realizarse en una realización cambiando el pH, la fuerza iónica o los iones caotrópicos en solución o cualquier combinación de los mismos.

El valor de K_D puede verse influenciado por condiciones cambiantes como el pH, la fuerza iónica, la temperatura y las propiedades polares. Desafortunadamente, los valores de la bibliografía para K_D no siempre se enumeran en condiciones de elución pertinentes. El experto en la materia podrá encontrar condiciones de elución que solo rompan la unión más débil sin alterar la unión más fuerte en los casos en los que la unión a la matriz sólida sea suficientemente fuerte (es decir, $K_{D,s} < 10^{-9}$ M y la relación entre los valores de K_D son al menos 1 cuando se miden en condiciones de unión convencionales). Los criterios para seleccionar los pares de unión específicos de la invención se parecen a los de la cromatografía de afinidad tradicional con respecto a la constante de disociación, la especificidad, la unión y posibles condiciones de elución. Sin embargo, puesto que las condiciones de elución por lo general son diferentes de las condiciones aplicadas cuando se miden K_D en el instrumento Biacore en la presente invención, los límites establecidos para los intervalos aplicables de las dos afinidades de unión distintas del TBP se han determinado en condiciones convencionales.

Los criterios para seleccionar los dominios de unión a ligandos específicos de la invención son algo diferentes de los criterios utilizados en la cromatografía de afinidad tradicional, ya que la molécula de TBP no se eluye del soporte.

Los dominios de unión que son específicos y fuertes, pero que no pueden romperse en condiciones normales de elución no son adecuados para la cromatografía de afinidad tradicional. Dichos dominios de unión pueden usarse en la presente invención. Los ejemplos incluyen la unión muy específica de biotina-estreptavidina, que para la mayoría de las aplicaciones prácticas no puede revertirse en condiciones de elución y, en consecuencia, es muy adecuada como uno de los pares de unión de la invención.

En general, la unión entre TBP y el ligando debe ser más fuerte que la unión entre TBP y la diana y suficientemente fuerte para evitar la fuga de la molécula de TBP desde el soporte durante la elución de la diana.

Los pares de unión ligando-TBP preferidos son fuertes y muestran poca o ninguna reducción en la fuerza de unión debido al cambio de pH, fuerza iónica, disolventes, agentes caotrópicos, temperatura, etc.

En una realización, el TBP es un polipéptido de fusión. Dichos polipéptidos de fusión pueden prepararse uniendo químicamente dos proteínas apropiadas o, como alternativa, en otra realización, la proteína de fusión puede producirse como un polipéptido recombinante. El polipéptido de fusión puede unirse de cualquier manera adecuada, por ejemplo, mediante un segmento enlazador, y el polipéptido de fusión debería comprender al menos los dominios de unión de las proteínas seleccionadas. El péptido enlazador debe seleccionarse de manera que no sea inestable, lo que daría como resultado degradación. El enlazador podría ser, por ejemplo, un enlazador altamente O-glicosilado como enlazadores entre dominios catalíticos y dominios de unión a hidratos de carbono conocidos a partir de carbohidrasas fúngicas, o podrían ser enlazadores ricos en prolina.

En otra realización, el TBP está compuesto de fragmentos. Dicho fragmento puede, por ejemplo, acoplarse de forma covalente mediante técnicas de ligadura u oligomerización de péptidos específicas de sitio y/o catalizadas por enzimas.

El TBP comprende al menos una primera funcionalidad de unión capaz de unirse a la molécula diana con la especificidad de unión deseada como se describe. La primera funcionalidad de unión puede estar comprendida en la proteína completa o puede ser un fragmento de la proteína que ha conservado su especificidad de unión. Se han descrito muchas proteínas en la bibliografía que muestran afinidad hacia biomoléculas, por ejemplo, péptidos, proteínas, ADN, RNA, hidratos de carbono, y todas las proteínas o fragmentos de las mismas son potencialmente útiles en el contexto de la presente invención como candidatos para el TBP.

Por tanto, dicha primera funcionalidad de unión dirigida hacia la molécula diana puede seleccionarse, por tanto, en una realización, pero sin limitación, entre el grupo que consiste en proteína A, fragmentos de proteína A, dominios derivados de proteína A (por ejemplo, dominios conocidos como affibody®), anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, lipocalinas y lectinas.

Se ha aplicado ingeniería combinatoria de proteínas para desarrollar proteínas artificiales que pueden unirse a dianas seleccionados con alta afinidad y usarse como alternativas a los anticuerpos (Nygren, P.-Å. y Skerra, A. (2004). *Binding proteins from alternative scaffolds*. *J. Immunol. Methods*, 290, págs. 3-28; Binz, H. K. & Pluckthun, A.

- (2005). *Engineered proteins as specific binding reagents*. *Curr. Opin. Biotech.* 16, p. 459-469). En el contexto de la presente invención, el término "anticuerpo" define una clase de proteínas modificadas genéticamente seleccionadas por su actividad de unión específica hacia una diana deseada y basada en el dominio Z, que es un huso de tres hélices de 58 restos derivado de la sustitución de un solo aminoácido en el dominio B de la proteína A estafilocócica (SPA) (Nilsson, B., Moks, T., Jansson, B., Abrahamssén, L., Elmblad, A., Holmgren, E. et al. (1987) *Protein Eng* 1, p. 107-113). El dominio Z se une a la región Fc de las inmunoglobulinas al igual que los cinco dominios SPA homólogos, pero a diferencia del dominio parental, no se une a la región Fab. Dichos anticuerpos son ejemplos de un dominio de unión derivado de proteína A.
- 10 El TBP también comprende al menos una segunda funcionalidad de unión capaz de unirse al ligando de captura inmovilizado sobre el soporte (sólido). Esta segunda funcionalidad de unión puede estar comprendida en la proteína completa o puede ser un fragmento de la proteína que ha conservado su especificidad de unión. En una realización, la segunda funcionalidad de unión se selecciona, pero sin limitación, entre el grupo que consiste en avidina, estreptavidina, neutravidina, receptor de esteroides, anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, amiloglucosidasa (AMG),
- 15 dominio enzimático (por ejemplo, dominio de unión a celulosa, CBD), lipocalinas y lectinas. Como se ha indicado anteriormente, estos candidatos, para la segunda funcionalidad de unión, se entienden como ejemplos que ilustran la invención, sin embargo, estos ejemplos no deben verse como las únicas combinaciones utilizables.
- 20 En una realización, el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en anticuerpos de llama y camello.
- En una realización particular, el TBP utilizado de acuerdo con la invención comprende al menos un dominio de unión de proteína A fusionado a al menos un dominio de unión a biotina de avidina, estreptavidina o neutravidina.
- 25 En una realización particular, el TBP utilizado de acuerdo con la invención comprende al menos un dominio de unión de un dominio de unión derivado de proteína A fusionado con al menos un dominio de unión a biotina de avidina, estreptavidina o neutravidina.
- 30 En otra realización particular, el TBP comprende al menos un dominio de unión de un anticuerpo fusionado con al menos un dominio de unión a biotina de avidina, estreptavidina o neutravidina.
- 35 En otra realización particular, el TBP comprende al menos un dominio de unión de un anticuerpo fusionado con al menos un dominio de unión a biotina de avidina, estreptavidina o neutravidina.
- En otra realización particular, el TBP comprende al menos un dominio de unión de la proteína A fusionado con AMG, CBD o (VhhRR6(R2)) (VhhRR6(R2)) indicando la región variable de un anticuerpo monocatenario de llama que reacciona frente a el azo-colorante de hapteno Rojo Reactivo (RR6) (Frenken et al. *J. Biotechnology* 78 (2000) 11-21).
- 40 En otra realización particular, el TBP comprende al menos un dominio de unión de un dominio de unión derivado de proteína A fusionado con AMG, CBD o (VhhRR6(R2)).
- En otra realización particular, el TBP comprende al menos un dominio de unión de un anticuerpo fusionado con AMG, CBD o (VhhRR6(R2)).
- 45 En otra realización particular, el TBP comprende al menos un dominio de unión de un anticuerpo fusionado con AMG, CBD o (VhhRR6(R2)).
- 50 El TBP puede, como se ilustra en los ejemplos, unirse químicamente; sin embargo, una forma más rentable de producir el TBP sería expresarlo como proteína de fusión recombinante.
- En una realización de la invención, el polipéptido de fusión se produce como polipéptido recombinante.
- 55 En una realización particular, la proteína de fusión se expresa como proteína recombinante, en particular, la proteína de fusión es, en una realización, estreptavidina recombinante unida a la proteína A. Dicha proteína de fusión puede producirse intracelularmente en *E. coli* como se describe en Sano (T. Sano y C. R. Cantor (1991) *BioTechnology* 9 págs. 1378-1381), usando preferentemente la construcción pTSAPA-2 que lleva dos dominios de unión a IgG. Sin embargo, esta construcción no es industrialmente factible ya que la producción intracelular con recuperación de cuerpos de inclusión en *E. coli* no proporciona rendimientos relevantes industrialmente y el proceso de producción es altamente complejo. Un proceso basado en una proteína de fusión secretada producida, por ejemplo, en *Bacillus* o
- 60 *Aspergillus* es de mucha mayor relevancia industrial.
- La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión puede expresarse preferentemente insertando la secuencia de nucleótidos o una construcción de ácido nucleico que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se ubica en el vector de manera que la secuencia codificante esté unida operativamente a las secuencias de control apropiadas para la expresión.
- 65

- 5 El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y pueda provocar la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector normalmente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula hospedadora en la que ha de introducirse el vector. Los vectores pueden ser plásmidos circulares lineales o cerrados.
- 10 El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para garantizar la autorreplicación. Como alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduzca en la célula hospedadora, se integre en el genoma y se replique junto con el cromosoma o cromosomas en los que se ha integrado. Además, puede usarse un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contengan el ADN total que ha de introducirse en el genoma de la célula hospedadora o un transposón.
- 15 Los vectores contienen preferentemente uno o más marcadores seleccionables que permiten una selección fácil de células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia a biocidas o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares.
- 20 Un gen condicionalmente esencial puede funcionar como un marcador seleccionable no antibiótico. Son ejemplos no limitantes de marcadores bacterianos condicionalmente esenciales no seleccionables con antibióticos los genes *dal* de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* u otros bacilos, que solo son esenciales cuando la bacteria se cultiva en ausencia de D-alanina. Además, los genes que codifican enzimas implicadas en el recambio de UDP-galactosa pueden actuar como marcadores condicionalmente esenciales en una célula cuando la célula crece en presencia de galactosa o en un medio que da lugar a la presencia de galactosa. Son ejemplos no limitantes de dichos genes los
- 25 de *B. subtilis* o *B. licheniformis* que codifican fosforilasa dependiente de UTP (EC 2.7.7.10), uridililtransferasa dependiente de UDP-glucosa (EC 2.7.7.12) o UDP-galactosa epimerasa (EC 5.1.3.2). También puede usarse un gen de xilosa isomerasa tal como *xylA*, de bacilos como marcadores seleccionables en células cultivadas en medio mínimo con xilosa como única fuente de carbono. Los genes necesarios para utilizar gluconato, *gntK* y *gntP* también pueden usarse como marcadores seleccionables en células cultivadas en medio mínimo con gluconato como única
- 30 fuente de carbono. Se conocen en la técnica otros ejemplos de genes condicionalmente esenciales. Los marcadores antibióticos seleccionables confieren resistencia antibiótica a antibióticos tales como ampicilina, kanamicina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, neomicina, higromicina o metotrexato.
- 35 Son marcadores adecuados para células hospedadoras de levadura ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores seleccionables para su uso en una célula hospedadora de hongo filamentoso incluyen, pero sin limitación, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfinotricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa) y *trpC* (antranilato sintasa), así como equivalentes de los mismos. Los preferidos para su uso en una célula de *Aspergillus* son los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.
- 40 Los vectores preferentemente contienen un elemento o elementos que permiten la integración del vector en el genoma de la célula hospedadora o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.
- 45 Para la integración en el genoma de la célula hospedadora, el vector puede confiar en la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Como alternativa, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula hospedadora en una ubicación o ubicaciones precisas en el cromosoma o cromosomas. Para aumentar la
- 50 probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos de integración deben contener preferentemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10.000 pares de bases, preferentemente de 400 a 10.000 pares de bases y mucho más preferentemente de 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad con la secuencia diana correspondiente para potenciar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga con la secuencia diana en el genoma
- 55 de la célula hospedadora. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos codificantes o no codificantes. Por otro lado, el vector puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora mediante recombinación no homóloga.
- 60 Para la replicación autónoma, el vector puede comprender adicionalmente un origen de replicación que permita al vector replicarse de manera autónoma en la célula hospedadora en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador de plásmidos que medie la replicación autónoma que actúa en una célula. La expresión "origen de replicación" o "replicador plasmídico" se define en el presente documento como una secuencia de nucleótidos que permite que un plásmido o vector se replique *in vivo*.
- 65 Son ejemplos de orígenes bacterianos de replicación los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAM β 1 que permiten

la replicación en *Bacillus*.

Son ejemplos de orígenes de replicación para su uso en una célula hospedadora de levadura el origen de replicación de 2 micrómetros, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

Son ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula de hongo filamentoso AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, *Gene* 98: 61-67; Cullen et al., 1987, *Nucleic Acids Research* 15: 9163-9175; documento WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen puede conseguirse de acuerdo con los métodos desvelados en el documento WO 00/24883.

Puede insertarse más de una copia de un polinucleótido que codifica el TBP de la presente invención en la célula hospedadora para aumentar la producción del producto génico. Un aumento en el número de copias del polinucleótido puede obtenerse integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula hospedadora o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde las células que contienen copias del gen marcador seleccionable amplifican, y, de ese modo, pueden seleccionarse copias adicionales del polinucleótido, para cultivar las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

Los procedimientos utilizados para ligar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son bien conocidos para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, citado anteriormente).

Las células hospedadoras recombinantes, que comprenden un polinucleótido que codifica el TBP de la presente invención, se usan ventajosamente en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende un polinucleótido que codifica el TPB de la presente invención se introduce en una célula hospedadora de manera que el vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante como se ha descrito anteriormente. La expresión "célula hospedadora" abarca cualquier progenie de una célula parental que no sea idéntica a la célula parental debido a mutaciones que se producen durante la replicación. La elección de una célula hospedadora en gran parte dependerá del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

La célula hospedadora puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procarionta o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

Son microorganismos unicelulares útiles las células bacterianas tales como bacterias grampositivas que incluyen, pero sin limitación, una célula de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* y *Streptomyces murinus*, o bacterias gramnegativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas* sp. En un aspecto preferido, la célula hospedadora bacteriana es una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. En otro aspecto preferido, la célula de *Bacillus* es un *Bacillus* alcalófilo.

La introducción de un vector en una célula hospedadora bacteriana puede, por ejemplo, efectuarse mediante transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), usando células competentes (véase, por ejemplo, Young y Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829 o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751) o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

La célula hospedadora también puede ser una célula eucariota, tal como un mamífero, insecto, célula vegetal o fúngica.

En un aspecto preferido, la célula hospedadora es una célula fúngica. "Hongos" como se usa en el presente documento, incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota (según define Hawksworth et al., En, *Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi*, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) así como el Oomycota (como se cita en Hawksworth et al., 1995, citado anteriormente, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth et al., 1995, citado anteriormente).

En un aspecto más preferido, la célula hospedadora fúngica es una célula de levadura. "Levadura", como se usa en el presente documento, incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidiosporógena y levadura que pertenece a los Hongos Imperfectos (Blastomicetos). Puesto que la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de la presente invención, la levadura se definirá como se describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M. y Davenport, R.R., eds, *Soc. App. Bacteriol. Symposium Series N.º 9*, 1980).

En un aspecto incluso más preferido, la célula hospedadora de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

En un aspecto mucho más preferido, la célula hospedadora de levadura es una célula de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviiformis*. En otro aspecto mucho más preferido, la célula hospedadora de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*. En otro aspecto mucho más preferido, la célula hospedadora de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

En otro aspecto más preferido, La célula hospedadora fúngica es una célula de hongo filamentoso. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (según define Hawksworth *et al.*, 1995, citado anteriormente). Los hongos filamentosos generalmente se caracterizan por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo del carbono es obligatoriamente aeróbico. Por el contrario, el crecimiento vegetativo de levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es por gemación de un talo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.

En un aspecto incluso más preferido, la célula hospedadora de hongo filamentoso es una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

En un aspecto mucho más preferido, la célula hospedadora de hongo filamentoso es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto mucho más preferido, la célula hospedadora de hongo filamentoso es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto mucho más preferido, la célula hospedadora de hongo filamentoso es una célula de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa* o *Ceriporiopsis subvermispora*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

Las células fúngicas pueden transformarse mediante un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida en sí. Los procedimientos adecuados para la transformación de células hospedadoras de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en el documento EP 238 023 y Yelton *et al.*, 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 1470-1474. Los métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* se describen en Malardier *et al.*, 1989, *Gene* 78: 147-156 y el documento WO 96/00787. La levadura puede transformarse usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, En Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, Volumen 194, págs. 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito *et al.*, 1983, *Journal of Bacteriology* 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 1920.

El ligando de captura utilizado de acuerdo con la invención se fija de forma covalente al soporte. Como se ha explicado anteriormente, el ligando de acuerdo con la presente invención es diferente del ligando utilizado en la cromatografía de afinidad tradicional donde el fin del ligando es unirse a la diana. En la presente invención, el ligando debería unirse al TBP. Los ligandos son bien conocidos en la técnica y a continuación se proporcionan ejemplos que pueden aplicarse de acuerdo con la invención. En el contexto de la presente invención, en una realización particular en lugar de un ligando fijado a la fase sólida, la fase sólida podría comprender como alternativa una afinidad de unión o un sitio de unión hacia el TBP. Un ejemplo podría ser la celulosa como fase sólida y el CBD (dominio de unión a celulosa) como parte del TBP.

El ligando (por ejemplo, biotina o moléculas específicas similares de bajo peso molecular (BPM)) se fija de forma covalente a este material. Pueden seleccionarse varias químicas de acoplamiento de moléculas de ligando al soporte sólido entre los libros de texto sobre el tema (*Protein Purification*, 1998, 2ed, eds. Janson, J-C., Ryden, L, Wiley & sons inc. Nueva York). En función de la tarea de purificación particular, el mejor candidato de derivados de ligando se acopla a la mejor opción de soporte sólido, por ejemplo, matriz o partículas en fase sólida. Las propiedades del proceso de producción de la matriz sólida de afinidad se analizan a través de ensayos prácticos de laboratorio y piloto.

Los ligandos pueden fijarse al material en fase sólida mediante cualquier tipo de enlace covalente conocido en sí para este fin, ya sea mediante una reacción química directa entre el ligando y el material en fase sólida o mediante

una activación previa del material en fase sólida o del ligando con un reactivo adecuado conocido en sí que permite unir la cadena principal de la matriz y el ligando. Son ejemplos de dichos reactivos activadores adecuados epiclorhidrina, epibromhidrina, alil glicidiléter; bis-epóxidos tales como butanodioldiglicidiléter; compuestos alifáticos sustituidos con halógeno tales como di-cloro-propanol, divinil sulfona; carbonildiimidazol; aldehídos tales como dialdehído glutárico; quinonas; bromuro de cianógeno; peryodatos tales como sodio-meta-peryodato; carbodiimidias; cloro-triazinas tales como cloruro cianúrico; cloruros de sulfonilo tales como cloruros de tosilo y cloruros de tresilo; N-hidroxi succinimidas; tolueno-4-sulfonatos de 2-fluoro-1-metilpiridinio; oxazolonas; maleimidas; piridil disulfuros; e hidrazidas. Entre estos, los reactivos activadores que dejan un grupo espaciador SP1 diferente de un enlace sencillo, por ejemplo, epiclorhidrina, epibromhidrina, alil-glicidiléter; bisepóxidos; compuestos alifáticos sustituidos con halógeno; divinil sulfona; aldehídos; quinonas; bromuro de cianógeno; clorotriazinas; oxazolonas; maleimidas; piridil disulfuros; e hidrazidas, son los preferidos.

En una realización, el ligando se elige entre, pero sin limitación, el grupo que consiste en biotina, acarbosa, esteroides, haptenos, epítipo-péptidos, colorantes e inhibidores enzimáticos. En una realización particular, el ligando es biotina. El ligando puede fijarse químicamente al soporte. En un aspecto particular, el soporte es un soporte sólido. Los soportes preferidos son robustos y baratos. El material puede ser el mismo que el utilizado en la cromatografía de afinidad tradicional o los materiales utilizados en el intercambio iónico, la cromatografía de interacción hidrófila y la filtración de agua o similares. Preferentemente, el soporte con ligandos inmovilizados no es susceptible a cambios químicos o actividad microbiana durante el almacenamiento o uso.

El soporte puede estar en forma de partículas claramente separadas, perlas o en forma de láminas, membranas, pasadores, mallas u otras construcciones tridimensionales. El soporte puede funcionalizarse principalmente sobre la superficie o todo el material. El soporte puede ser un sólido rígido, semirrígido o un gel blando.

Los materiales de soporte preferidos incluyen los adsorbedores de membrana Sartobind y las membranas SartoAIM (Sartorius Stedim), micropartículas de látex de poliestireno y perlas de Sefarosa y Superosa (GE Healthcare).

Debe comprenderse que el soporte puede compactarse como perlas en columnas, como láminas o membranas dispuestas en construcciones cilíndricas o apiladas o flotando libremente en un líquido.

El último soporte se recoge y se lava con operaciones unitarias como sedimentación, centrifugación, filtración, filtración cruzada o fibras huecas como se ha descrito anteriormente.

Otros materiales de soporte comprenden cualquier material natural o sintético y orgánico o inorgánico que se sepa que es aplicable en sí en la separación de proteínas en fase sólida y otras biomoléculas, por ejemplo, polisacáridos naturales o sintéticos tales como agar-agar y agarosa; celulosas, éteres de celulosa tales como hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa; almidones; gomas tales como goma guar y goma arábica, goma ghatti, goma de tragacanto, goma garrofin, goma de xantano; pectinas; mucinas; dextranos; quitinas; quitosanos; alginatos; carrageninas; heparinas; gelatinas; polímeros sintéticos tales como poliamidas tales como poliacrilamidas y polimetacrilamidas; poliimidias; poliésteres; poliéteres; compuestos de vinilo poliméricos tales como polivinil alcoholes y poliestirenos; polialquenos; materiales inorgánicos como materiales de silicio tales como dióxido de silicio, incluyendo sílice amorfa y cuarzo; sílices; silicatos metálicos, vidrios de poro controlado y cerámica; óxidos y sulfuros metálicos o combinaciones de estos materiales naturales o sintéticos y orgánicos o inorgánicos. La cadena principal de la matriz se selecciona preferentemente entre agar-agar, agarosas, celulosas, éteres de celulosa tales como hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, poliamidas tales como poli(met)acrilamidas, polivinilalcoholes, sílices y vidrios de poro controlado.

Son materiales de fase sólida particulares como cadenas principales de matriz, por ejemplo, perlas de agar o agarosa, tales como perlas de Sefarosa y Superosa de GE Healthcare y Biogel A de Biorad; perlas a base de dextrano tales como Sephadex, GE Healthcare; perlas y membranas a base de celulosa tales como celulosa de Lontosorb; perlas compuestas tales como Sephacryl y Superdex, GE Healthcare; perlas de polímeros orgánicos sintéticos tales como Fractogel de Tosoh Lifesciences LLC; medios POROS de Applied Biosystems, Bio-Rex, Bio-Gel P y Macro Prep de Biorad, HEMA y Separon de TESSEK y medios Hyper D y Trisacryl de Pall Corporation, Enzacryl y Azlactone, 3M; perlas de materiales de silicio tales como vidrio de poro controlado, PROSEP, de Millipore y Spherocil, Pall Corporation; y compuestos de sílice recubiertos en forma de perlas o membranas tales como ACTI-DISK, ACTI-MOD y CycloSep de Arbor Technologies. Otro tipo de operaciones unitarias de relevancia para la separación del complejo de la molécula de TBP-diana, lavar o recoger la molécula diana comprende procesos de extracción líquida.

Los procesos de extracción líquida o la extracción con disolventes utilizan los componentes de solubilidad relativa y preferencia por diferentes fases líquidas inmiscibles. Mediante la separación de las fases, la separación de los componentes puede facilitarse de manera eficiente a escala industrial.

De particular relevancia para los sistemas acuosos de dos fases de la presente invención que usan mezclas de polímeros, se incluyen sales kosmótropas o caótropas.

Se conoce PEG-Dextrano, PEG-carbonato de sodio, PEG y fosfatos, citratos o sulfatos y diversos sistemas acuosos a base de hidroxipropil almidón, almidón, agar o gelatina, para la extracción de biomoléculas lábiles. Los sistemas de dos fases acuosos preferidos comprenden soluciones al 10-15 % de PEG, fosfato y cloruro de sodio a pH 6.

- 5 Otros métodos de extracción líquida preferibles usan la denominada fase crítica o extracción de fase supercrítica usando gases o líquidos por encima de un punto crítico donde pueden comportarse como disolventes orgánicos. El agua y el dióxido de carbono son los fluidos supercríticos más utilizados.

10 La formación del complejo entre la molécula diana y el TBP en solución antes de las etapas de separación permite varios flujos de trabajo de purificación corriente abajo atractivos.

15 El flujo de trabajo puede consistir en varias operaciones unitarias generales, es decir, i) formación de un complejo en solución de acuerdo con la invención, ii) una o varias etapas de separación, iii) una etapa del proceso en la que se disuelve el complejo entre la molécula diana y el TBP, iv) una operación en la que se retira el TBP y v) una etapa en la que se recoge la diana. Debe comprenderse que el orden y el número de etapas individuales y operaciones unitarias pueden variar.

20 Los flujos de trabajo pueden diseñarse con una etapa de captura de TBP antes o después de la disolución del complejo. Además, los flujos de trabajo pueden usar perlas de unión de TBP específicas u otros soportes en suspensión libre, flotantes, fluidizados o compactados en columnas.

Ejemplos no limitantes de combinaciones de operaciones unitarias o flujos de trabajo incluyen:

- 25 1. Incubación de la molécula diana y TBP en solución en volumen con o sin tampón de potenciación añadido
2. Transferencia a columna compactada con soporte de unión a TBP
3. Lavado de columna con soporte unido al complejo TBP-Diana
- 30 4. Elución de la diana usando, por ejemplo, un tampón de pH bajo
5. Recogida de la diana
- 35 6. Cambio de tampón en la solución de diana

Otra secuencia de flujo de trabajo usando soporte de unión a TBP en forma de perlas

- 40 1. Incubación de la diana y TBP en solución en volumen con tampón de potenciación añadido
2. Adición de perlas con capacidad de unión específica a TBP
3. Lavado de perlas en centrífuga o sistema de filtración de membrana
- 45 4. Elución de perlas a pH bajo
5. Retirada de perlas mediante centrifugación o sedimentación
6. Cambio de tampón en la solución de diana
- 50 7. Recogida de la diana

Otra secuencia de flujo de trabajo usando complejo aislado, seguido de la disolución del complejo y la retirada de TBP con un material de soporte:

- 55 1. Incubación de la diana y TBP en solución en volumen con tampón de potenciación de precipitación añadido
2. Centrifugación y aislamiento del complejo TBP-Diana
- 60 3. Disolución de complejos precipitados en tampón de pH bajo
4. Pase de la solución a través de la membrana de unión de TBP para retirar TBP
5. Cambio de tampón en la solución de diana
- 65 6. Recogida de la diana

Sin embargo, una secuencia de flujo de trabajo que usa una etapa de precipitación general y una etapa de precipitación específica de la diana:

- 5 1. Tratamiento de la solución de diana en condiciones generales de precipitación de proteínas por adición de sal
2. Centrifugación para recoger precipitados
3. Disolución de proteínas precipitadas en tampón apropiado bajo en sal
- 10 4. Incubación de la diana y TBP en solución en volumen con tampón de potenciación de precipitación añadido
5. Centrifugación y aislamiento del complejo TBP-Diana
- 15 6. Disolución de complejos precipitados en tampón de pH bajo
7. Pase de la solución a través de la membrana de unión de TBP para retirar TBP
8. Cambio de tampón en la solución de diana
- 20 9. Recogida de la diana

Debe comprenderse que la secuencia de formación del complejo, el aislamiento, la disolución del complejo y la retirada de TBP pueden repetirse. Además, pueden usarse diferentes tampones potenciadores de la precipitación en etapas repetidas y pueden incluirse etapas de concentración.

25 El complejo TBP-Diana formado de acuerdo con la invención permite un flujo de trabajo de purificación corriente abajo verdaderamente continuo, ya que la molécula diana puede recogerse en un proceso continuo. Un ejemplo no limitante de combinaciones de operaciones unitarias o flujos de trabajo incluye

- 30 1. Mezcla de diana y TBP en una corriente continua
2. Separación continua del complejo TBP-Diana
- 35 3. Disolución del complejo mediante la adición de un tampón de pH bajo
4. Captura de TBP mediante la adición de perlas
5. Separación continua de perlas con TBP
- 40 6. Recogida de la diana

Más detalladamente, por ejemplo

- 45 1. Se mezclan TBP, diana y tampón en una corriente continua y se alimentan a una centrífuga continua
2. El complejo se separa de forma continua en una corriente y la otra corriente se descartó
- 50 3. A la corriente que contiene el complejo de molécula de TBP-Diana se le añade un tampón de pH bajo para separar la biomolécula diana y TBP, antes de
4. Añadirse micropartículas con un ligando específico de TBP para capturar la molécula de TBP
5. Las micropartículas se separan en una corriente usando una centrifugadora continua o sedimentación
- 55 6. La corriente que contiene la diana se concentra y el tampón se cambia en un sistema continuo de fibra hueca, antes
7. La corriente diana se recoge y se procesa adicionalmente en etapas de pulido

60 En las operaciones unitarias esbozadas anteriormente, debe recogerse la diana. Esta operación requiere disolver o eluir el complejo formado de acuerdo con la invención, que en el contexto de la presente invención debe comprenderse como el tratamiento del complejo en condiciones de manera que las moléculas de TBP y de diana se separen predominantemente entre sí. Las condiciones deben dejar la molécula diana intacta e inalterada.

65 Esto puede hacerse mediante condiciones bien conocidas por el experto. Numerosos reactivos de elución listos para usar están disponibles en el mercado y los protocolos son accesibles para el dominio público. Las posibles

condiciones favorables de disolución o elución comprenden el cambio del pH, el contenido de sal, la temperatura o la inducción de esfuerzo de cizalla al complejo. Además, la condición puede comprender cambiar las condiciones de equilibrio añadiendo cantidades competitivas de componentes de unión.

- 5 Debe comprenderse que se prefiere que las condiciones de disolución o elución dejen sin alterar las funcionalidades de unión en el TBP hacia el soporte. La elección de las condiciones depende de la naturaleza de la unión TBP-diana.

- 10 Por ejemplo, las condiciones preferidas para revertir la unión de proteína A a inmunoglobulina incluyen el uso de un tampón de glicina a pH 2-4, un tampón de citrato a pH 3-4, sales caótopas, reactivos de formación de complejos de metales, tampones neutros especiales como Tampón de Unión Gentle Ag/Ab (Thermo scientific Product n.º 21012) o añadiendo pequeñas moléculas que imitan el patrón de unión de la inmunoglobulina diana para competir con el TBP.

- 15 El proceso de purificación de acuerdo con la invención como se ha descrito en detalle anteriormente puede usarse en un kit basado en dicho proceso.

Por tanto, en un aspecto adicional, la invención desvela un kit para la optimización de la formación de complejo que comprende un TBP adecuado y un material de soporte para retirar el TBP.

- 20 Los kits preferidos para la purificación de una molécula diana específica incluyen i) la proteína de unión a la diana (TBP) suministrada en una solución concentrada, ii) mezclas concentradas de tampón adecuadas para la formación del complejo y la disolución del complejo de la diana y el TBP, respectivamente, iii) material de soporte para retirar TBP y iv) directrices de instrucción.

- 25 Un kit puede contener adicionalmente componentes y directrices de instrucción para optimizar la concentración de TBP usando un ensayo de turbidimetría, nefelometría o similar, y opcionalmente software y algoritmos informáticos. Componentes adicionales podrían incluir, por ejemplo, patrones apropiados.

- 30 Todos los reactivos, tampones y materiales de soporte se proporcionan preferentemente como soluciones estériles.

- Dichos kits también pueden usarse convenientemente para seleccionar una biblioteca que comprenda uno o más clones que expresan TBP frente a una diana de interés. Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para seleccionar un TBP adecuado para la formación de complejo con un polipéptido diana de interés que comprende: (a) poner en contacto TBP individuales obtenibles de una biblioteca de TBP con la diana de interés y (b) determinar la formación de complejo.

El método de selección anterior en una realización adicional comprende añadir un tampón de potenciación complejo y/o cambiar la relación de diana a TBP en la etapa (a).

40 Ejemplos

Ejemplo 1. Procedimiento de conjugación de proteínas químico selectivo SPDP-SMCC:

- 45 El ejemplo describe el método de conjugación químico selectiva utilizado para la preparación de conjugados de Proteína A-Avidina.

- 50 La Proteína A se activó con 3-(2-piridildio)propionato de *N*-succinimidilo (SPDP), seguido de reducción con Ditiotreitilo (DTT) para proporcionar tioles libres, que se hizo reaccionar con Avidina activada con succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC).

Todas las incubaciones se realizaron en un baño de agua a temperatura controlada a 30 °C y las mezclas se agitaron con una barra magnética en miniatura en tubos de reacción de polipropileno sellados. Las columnas PD MidiTrap (GE Healthcare) se equilibraron todas de acuerdo con las instrucciones del producto antes de su uso.

- 55 Se prepararon dos tampones de reacción: Tampón 1: HEPES 50 mM (Applichem, N.º de cat. A1069), NaCl 100 mM (Merck, N.º de cat. 1.06404), EDTA 2 mM, pH 7,0 y tampón 2: MES 50 mM (Sigma, N.º de cat. M2933), NaCl 100 mM, EDTA 2 mM, pH 6,0.

- 60 Las mezclas recién preparadas de SPDP, SMCC, DTT, *N*-etil-maleimida (NEM) y cisteína se mantuvieron en un baño de hielo antes del uso:

Preparación de Avidina y Proteína A:

- 65 Se disolvieron Avidina (Sigma, N.º de cat. A9275) y Proteína A (GE Healthcare, N.º de cat. 17-0872-50) en el tampón n.º 1 (aproximadamente 28 y 24 mg/ml, respectivamente, 1,00 ml) desalado usando una columna PD MidiTrap (GE Healthcare). Las proteínas se eluyeron con tampón 1 (1,5 ml) y se recogieron. La concentración se midió por UV

(Abs280, 1 cm) 1,54, 62400 g/mol y (Abs280, 1 cm) 0,149, 42000 g/mol, respectivamente) y la concentración se ajustó a 15,0 mg/ml y 12,5 mg/ml con tampón 1, respectivamente.

Activación de avidina con SMCC:

5 Con alta precisión, se disolvió SMCC (Sigma, N.º de cat. M5525) en NMP seco (Sigma-Aldrich, N.º de cat. 494496, aproximadamente 1,00 ml, 16,00, 8,00 o 4,00 mg/ml)

10 La solución de SMCC (0,050 ml) se añadió rápidamente a la solución de Avidina. La mezcla de reacción agitada (Avidina:SMCC 1:10; 1:5 y 1:2,5 respectivamente) se incubó a 30 °C durante 30 minutos.

15 La mezcla de reacción (1,00 ml) se cargó en una columna PD MidiTrap y la Avidina modificada con maleimida se eluyó con tampón 2 (1,5 ml), se recogió (10 mg de Avidina/ml) y se usó para la interconjugación de Proteína A-Avidina.

Activación de Proteína A con SPDP:

20 Con alta precisión, se disolvió SPDP (Sigma, N.º de cat. P3415) en NMP seco (aprox. 1,00 ml, 18,8, 9,4 o 4,7 mg/ml).

25 A la solución de SPDP (0,050 ml) se le añadió la solución de Proteína A. La mezcla de reacción agitada (10 mg de Avidina/ml, Proteína A:SPDP 1:10; 1:5 y 1:2,5 respectivamente) se incubó a 30 °C en un baño de agua durante 30 minutos.

Se extrajo una muestra (0,30 ml) para analizar el grado de sustitución y se almacenó en frío, el resto de la mezcla se desprotegió inmediatamente con DTT.

Desprotección de la Proteína A modificada con tiol:

30 Se preparó recientemente una solución de DTT (Fluka, N.º de cat. 43819, 1 ml, 84 mg/ml en Tampón 1) y se añadieron 0,050 ml a 1,00 ml de la solución de Proteína A modificada con SPDP y la mezcla se incubó en un baño de agua durante 15 minutos.

35 La mezcla (1,00 ml) se cargó en una columna PD MidiTrap y la Proteína A modificada con tiol se eluyó con tampón 2 (1,5 ml), se recogió (6,35 mg de Proteína A/ml) y se usó inmediatamente para la interconjugación de Proteína A-Avidina.

Interconjugación:

40 La Avidina activada con Maleimida se mezcló con tampón 1 y la Proteína A funcionalizada con tiol, dando como resultado un total de 1,485 ml con 2,0 mg de Proteína A/ml y 3,0, 6,0 o 9,0 mg de Avidina/ml (1:1, 1:2 o 1:3 en relación molar, respectivamente).

45 Las mezclas de reacción de conjugación de proteínas, en total 1,485 ml, se dejaron incubar durante 15, 30 o 120 minutos, respectivamente.

50 Una variación adicional en la interconjugación de proteínas incluyó una dilución del 66 % y 33 % de los reactivos con tampón 2, dando como resultado 1,33 y 0,66 mg de Proteína A/ml y 2,0 o 4,0, Avidina/ml y 1,0 o 2,0 mg de Avidina/ml (1:1 o 1:2 en relación molar y con 66 % y 33 % de reducción en la concentración de proteínas, respectivamente). Estas mezclas de reacción de conjugación de proteínas se dejaron incubar durante 30 minutos.

Análisis de sustitución de SPDP:

55 Se preparó una solución de etanolamina (1 ml, al 10 % en Tampón 1). Se añadió solución de etanolamina (0,025 ml) a la muestra (0,300 ml) de la solución de proteína A modificada con SPDP.

60 La solución (0,250 ml) se cargó en una columna PD5 y la solución de Proteína A modificada con SPDP se eluyó con tampón 2 (0,750 ml) y se recogió. La solución se dividió en dos porciones iguales (0,300 ml) y se añadió solución de DTT (0,030 ml, 100 mM, 15,4 mg/ml en Tampón 2) o tampón 2 (0,030 ml), respectivamente.

65 Ambas soluciones se midieron a 343 nm (absorción) y se calculó el grado de sustitución de SPDP por Proteína A usando el coeficiente de extensión molar de 8000 para el grupo de 2-piridintiona. Los resultados se resumen en la figura 1.

Detención de las reacciones:

El proceso de conjugación se detuvo mediante la adición de NEM y cisteína;

5 Se preparó una solución de N-etil maleimida (NEM, Sigma, N.º de cat. E1271, 1,0 ml, 20 mg/ml en tampón 2) y cisteína (Fluka, N.º de cat. 30150, 1,0 ml, 40 mg/ml en tampón 2), en el momento.

10 Se añadió una solución de NEM (0,075 ml por ml de solución de reacción) a la mezcla de reacción de conjugación, la mezcla se incubó durante 15 minutos antes de añadir una solución de cisteína (0,075 ml por ml de solución de reacción). Los conjugados resultantes se almacenaron a 5 °C antes de la purificación por filtración en gel.

Se prepararon numerosos conjugados con variaciones de la activación con SMCC y SPDP, relación de Proteína A a Avidina, tiempo de interconjugación y concentración de interconjugación.

15 Procedimiento de conjugación a gran escala.

El ejemplo describe la preparación de conjugados a mayor escala.

20 Se prepararon varios conjugados de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente, sustituyendo las columnas PD Meditrap por columnas PD10 para la precipitación de proteínas por adición de sal (muestra de 2,50 ml y tampón de apilamiento y volumen de elución de 3,50 ml). Las concentraciones, relaciones, tiempo de reacción y temperatura fueron todos iguales. El volumen final entre conjugaciones fue hasta tres veces superior al del ejemplo 1.

25 La Figura 1 es una tabla que resume los conjugados preparados con respecto a las concentraciones, la estequiometría y el tiempo de reacción.

Purificación del conjugado de TBP:

30 Los conjugados de TBP en bruto se analizaron mediante filtración en gel en una columna Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare, 30 cm x 0,8 cm², volumen de columna 24 ml, caudal 0,40 ml/min) usando un tampón Hepes (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0). Se inyectaron muestras de 100 ul y se registró la absorbancia a 280 nm.

La columna Superdex 200 HR se calibró usando patrones de peso molecular.

35 Todos los conjugados preparados proporcionaron tres picos, asignados a la población de conjugados, una mezcla de diversos homopolímeros y pequeños conjugados y proteínas no unidas, respectivamente. La Proteína A era apenas visible debido al bajo coeficiente de extensión. ($A_{280} = 0,149$)

40 Se realizaron purificaciones preparativas de conjugado a mayor escala en Superdex 200 o Superdex 75 usando el mismo tampón que anteriormente (ambas columnas, GE Healthcare, 60 cm x 1,6 cm², volumen de columna 120 ml), caudal 1,00 ml/min). Se inyectaron muestras de 2,0 ml y se controló la absorbancia a 280 nm. Se recogieron fracciones de 1,00 ml.

45 El Conjugado 4, 5 y 11 se purificó en Superdex 200 y el conjugado 11 en Superdex 75.

Se realizaron purificaciones preparativas de conjugado a pequeña escala en columnas Superdex 200 o Superdex 75 más pequeñas (30 cm x 0,8 cm², volumen de columna 24 ml, caudal 0,40 ml/min). Se inyectaron muestras de 0,1-0,3 ml y se recogieron fracciones de 0,40 ml.

50 A continuación, los conjugados se sometieron a ensayo después de purificarse usando un método en bruto, rápido y fácil de producción para recoger y agrupar las fracciones de volumen vacío (columna de filtración en gel de grado de preparación Superdex 75, Vo a 42,5 ml). La concentración de proteína se ajustó a 1,00 mg/ml ($A_{280} = 0,983$) y se sometió a ensayo la capacidad de realizar purificación por afinidad.

55 **Ejemplo 2. Procedimiento de conjugación de proteínas químico selectiva usando SATA y SulfoSMCC:**

60 El ejemplo ilustra un método alternativo para preparar TBP usando un método químico selectivo usando Proteína A modificada con S-acetiltioacetato de N-succinimidilo ("SATA") y desenmascarar con hidroxilamina antes de acoplarse con 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo ("sulfo-SMCC") Avidina activada y purificada.

En resumen, las operaciones unitarias de conjugación fueron las mismas que en los ejemplos descritos anteriormente de forma detallada.

65 La Proteína A (2,6 mg/ml) se activó con SATA (8,8 equivalentes en fosfato 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2) durante 30 minutos, se desaló en una columna (PD5, G10) y se desacetiló con hidroxilamina (hidroxilamina 0,5 M, EDTA 25 mM

en PBS, pH 7,2) durante dos horas a temperatura ambiente.

La Avidina (5,8 mg/ml) se activó con sulfo-SMCC (9,7 equivalentes) en tampón PBS (fosfato 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2) durante 30 minutos.

5 El exceso de sulfo-SMCC cruzado se retiró haciéndolo pasar a través de una columna de desalación (EDTA 25 mM en PBS, pH 7,2) y se recogió, antes de la interconjugación.

10 La interconjugación 1:1 entre la Proteína A modificada con tiol (0,5 mg/ml) y la avidina activada con maleimido (0,8 mg/ml) se realizó durante la noche a temperatura ambiente a un pH casi neutro (fosfato 0,1 M, NaCl 0,15 M, EDTA 5 mM, pH 7,2).

15 La solución final de conjugado se aclaró mediante centrifugación a 11,00 G antes de que el TBP se purificase en High Prep Sephacryl S-100 como se ha descrito anteriormente, y se midió que fue de aproximadamente 0,30 mg/ml, se denominó conjugado n.º 18 y se usó en un ensayo de turbidimetría y para la purificación de inmunoglobulina.

Se estimó que la concentración fue de 0,30 mg/ml en función de la densidad óptica.

Ejemplo 3. Configuración del ensayo de turbidimetría

20 La medición de la formación de complejo se realizó en un ensayo de turbidimetría simple en un formato de microtitulación usando placas ELISA convencionales y un lector UV/VIS a 340 nm. El ensayo usó IgG de conejo como diana y diversas moléculas de TBP. Se mezclaron diferentes concentraciones de IgG, TBP y tampón en los micropocillos, el cambio en la absorbancia a 340 nm se registró con el tiempo y los datos se usaron para construir curvas de dosis-respuesta.

En resumen, la configuración general del ensayo fue la siguiente:

30 Se diluyeron seis soluciones de IgG diana (IgG de conejo, Dako X0903, 20 mg/ml) con tampón (PBS, pH 7,2) para cubrir el intervalo de concentraciones de interés, normalmente de 0,20 a 7,7 mg/ml en 0,80 ml.

La placa de micro titulación (NUNC 260836) se preparó haciendo primero las diluciones diana y el blanco, después de la adición del TBP diluido junto con diferentes tampones de reacción.

35 Se usaron diferentes tipos de tampón de reacción: GF: HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0 o un tampón de potenciación que contenía PEG (Dako n.º S2307).

40 Se pipetearon muestras diana (50 µl por pocillo) en los pocillos etiquetados A a F en la placa de microtitulación. Se pipetearon tampón de dilución (PBS, 50 µl por pocillo) y tampón de reacción (175 µl por pocillo) en los pocillos etiquetados G a H. Esto se repitió tantas veces como el número de soluciones de TBP sometidas a ensayo más uno.

A intervalos de 20 segundos, se pipeteó solución de TBP (125 µl) con una pipeta multicanal en los pocillos etiquetados A a G en la primera columna y después se pipeteó solución de TBP (125 µl) en los pocillos etiquetados A a G en la segunda columna y así sucesivamente. La última fila de la placa se usó como blanco de diana.

45 La placa se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en un mezclador de placas y la absorbancia se leyó a intervalos de 1 minuto. El punto final se leyó a 340 nm después de 10 minutos.

50 Los datos recopilados, incluyendo los blancos, se enumeraron en una hoja de cálculo y las curvas de respuesta a la dosis se representaron como la absorbancia a 340 nm frente a la concentración de diana para cada concentración de TBP.

55 Como control, se sometió a ensayo Proteína A en concentraciones de 0 a 1 mg/ml para determinar su capacidad de formar complejos y la turbidez con la IgG de conejo diana. Solo se observó una respuesta pequeña e insignificante, lo que confirma que la Proteína A libre o no conjugada no contribuyó a la respuesta en el ensayo de turbidimetría de las mezclas TBP-Diana.

Las curvas de dosis-respuesta se usaron para seleccionar las moléculas de TBP en bruto y purificadas de interés y la relación de TBP a diana, que se usó en la siguiente purificación de diana preparativa.

Ejemplo 4. Ensayo de turbidimetría de conjugados en bruto y purificados

65 El siguiente ejemplo ilustra la capacidad del TBP para formar complejos y turbidez con la molécula diana específica. Adicionalmente, el ejemplo ilustra cómo seleccionar y caracterizar el TBP antes y después de la purificación basada en turbidimetría.

Además, el ejemplo ilustra las curvas de dosis-respuesta de dos TBP hechos mediante dos métodos químicos

diferentes.

El ensayo de turbidimetría se usó para someter a ensayo conjugados de TBP antes de la purificación.

- 5 Todos los conjugados de TBP en bruto se diluyeron en el tampón patrón a aproximadamente 2,0 mg/ml.

La Figura 2 ilustra las curvas de dosis-respuesta a 340 nm después de haber restado el blanco.

- 10 Todos los conjugados de TBP (n.º 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 y 16) proporcionaron una absorbancia aumentada en función de una concentración diana aumentada. El conjugado N.º 13, el 3 y especialmente el N.º 12 proporcionaron una respuesta elevada.

- 15 Se purificaron cuatro conjugados de TBP, n.º 3, 11, 12 y 17 en una columna Superdex 75 como se ha descrito anteriormente. Los conjugados se recogieron como picos de volumen vacío. El conjugado n.º 3, 11 y 17 era la mezcla de dos agrupaciones de volúmenes vacíos de purificaciones por cromatografía superdex 75.

Las muestras purificadas se diluyeron a 1,0 mg/ml y se sometieron a ensayo en el ensayo de turbidimetría frente a concentraciones de diana crecientes.

- 20 La Figura 3 ilustra las curvas de dosis-respuesta a 340 nm después de haber restado el blanco. El conjugado n.º 12 nuevamente proporcionó la respuesta más elevada, con una meseta aparente que comenzó después de IgG 3,0 mg/ml.

- 25 El conjugado de TBP n.º 18 preparado mediante un método de conjugación SATA-sulfoSPDP, como se ha descrito anteriormente, se sometió a ensayo para determinar su capacidad para formar complejos con IgG diana de 0 a 2,75 mg/ml. La solución de TBP (0,3 g/l) de 200 µl se hizo reaccionar con muestras de IgG (34 µl, 16 µl, 8 µl, 4 µl o 0 µl de IgG de conejo) (20 g/l).

- 30 La Figura 4 ilustra las curvas de dosis-respuesta a 340 nm después de 30 segundos o 10 minutos, respectivamente, después de haber restado el blanco. El conjugado muestra turbidez clara en el nivel de diana más bajo en comparación con los conjugados anteriores.

- 35 Después de registrar la absorbancia, la placa con los pocillos individuales se dejó reposar durante aproximadamente una hora. La turbidez cambió para convertirse en una turbidez más densa y precipitada en los pocillos.

Ejemplo 5. Ensayo de turbidimetría con tampón de potenciación

- 40 El ejemplo ilustra el uso de un tampón de potenciación para aumentar la turbidez del complejo entre la IgG diana y el TBP.

- El ensayo de turbidimetría se realizó como se ha descrito anteriormente, excepto por que la dilución del TBP con (a) el tampón patrón (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0) o (b) un tampón que contenía PEG (Dako n.º S2307).

- 45 Se eligió TBP n.º 17, ya que este conjugado proporcionó una absorción más baja en el ensayo de turbidimetría en comparación con, por ejemplo, TBP n.º 12 (figura 3) y, por tanto, es un candidato válido para la potenciación.

Se diluyó conjugado n.º 17 (aproximadamente 1,41 mg/ml) 2 veces con tampón patrón o tampón que contenía PEG dando como resultado una concentración de 0,70 mg/ml.

- 50 En los pocillos que contenían la turbidez del tampón de potenciación, se observó claramente una fuerte turbidez después de unos minutos. La respuesta se registró con el tiempo y los resultados se representaron en la Figura 5.

- 55 La Figura 5 es la absorbancia usando el tampón patrón frente al tiempo para 5,71; 3,33; 1,48; 0,077 mg/ml, TBP y blanco de tampón, respectivamente.

La Figura 6 es la absorbancia para la preparación con el tampón de potenciación frente al tiempo para 5,71; 3,33; 1,48; 0,077 mg/ml, TBP y blanco de tampón, respectivamente.

- 60 La Figura 7 es la curva de dosis-respuesta de absorbancia frente a la concentración de diana registrada después de 10 minutos usando la versión (a) el tampón patrón (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0) o la versión (b) un tampón que contenía PEG.

- 65 Después de registrar la absorbancia, la placa con los pocillos individuales se dejó reposar durante toda la noche. Después de algunas horas, la turbidez cambió para ser más densa. Al día siguiente, se observó turbidez como precipitados en los pocillos que contenían el tampón de potenciación.

La Figura 7 ilustra claramente el fuerte efecto de cambiar los componentes del tampón mediante la adición del tampón que contenía PEG. El conjugado de TBP particular n.º 17 mejoró considerablemente con respecto a la capacidad de formar complejos con la diana en solución.

- 5 Los siguientes experimentos se realizaron para demostrar que las moléculas de TBP preparadas mediante la conjugación química selectiva simple de Proteína A y Avidina en combinación con un material de soporte de biotina simple pueden usarse para la purificación por afinidad de anticuerpos.

Ejemplo 6. Unión inespecífica a la columna

- 10 El experimento se realizó con el fin de someter a ensayo la unión inespecífica de la molécula diana de IgG a la matriz de afinidad de biotina agarosa simple.

- 15 Se compactaron tres alícuotas de 1,0 ml de biotina-agarosa (Sigma Chemicals, producto n.º B6885) en tres columnas de cromatografía idénticas (columna Bio-Rad y adaptador de flujo, producto n.º 737-1007 y n.º 738-0014), usando un tampón de equilibrio para la compactación (fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2). Una por una, las tres columnas con biotina agarosa se montaron en un sistema de cromatografía Äkta (GE Healthcare), se equilibraron y se usaron para los experimentos que se describen a continuación.

- 20 Se aplicó 1,00 ml de tampón de filtración en gel (HEPES 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,0) y 0,40 ml de IgG, (producto DAKO n.º X0903 (original 20 mg/ml), 4,3 g/l, 1,4 g/l o 0,7 g/l en tampón de equilibrio) a cada columna. Las columnas se lavaron con 7,5 ml de tampón de equilibrio y se eluyeron con 5 ml de tampón de elución (citrato de sodio 0,1 M, pH 3,5) a un caudal de 1,0 ml/min. La absorbancia a 280 nm y la conductividad se controlaron y registraron de forma continua.

- 25 La siguiente tabla resume los resultados. El primer pico corresponde al pico de flujo continuo y el segundo pico es el pico durante la elución posterior. Se enumera la distribución porcentual entre los dos picos.

IgG conc. g/l	Pico de flujo continuo Área (mUA*ml)	Pico de flujo continuo Área %	Pico de IgG Área (mUA*ml)	Pico de IgG Área %
4,3	545	99	4	1
1,4	138	98	3	2
0,7	58	95	3	5

- 30 Durante la elución, se recogieron fracciones de 1 ml y se analizaron mediante SDS-PAGE seguido de tinción con azul brillante de Coomassie. El análisis de las fracciones recogidas durante la elución mostró que la IgG pura compuesta de polipéptidos de cadena pesada (50 kDa) y cadena ligera (25 kDa) se eluyó de la columna.

- 35 No se observó unión significativa o elución posterior de IgG. Las concentraciones de IgG cargadas en la columna aparecieron en la fracción de flujo continuo, lo que indica que la molécula diana IgG no se une inespecíficamente a la columna de biotina agarosa simple.

Ejemplo 7. Purificación por afinidad gradual en solución y en columna

- 40 El experimento se realizó para demostrar que las moléculas de TBP pueden mezclarse con la molécula diana IgG en solución, formar espontáneamente un complejo, cargarse en una columna de biotina agarosa y lavarse a fondo para retirar cualquier contaminante no unido a la columna. Por último, mediante elución a pH bajo, se recogieron las moléculas diana.

- 45 Se usó TBP conjugado n.º 18 (Fracciones agrupadas de High Prep Sephacryl S-100 purificación, 0,30 mg/ml) a continuación.

- 50 Basándose en los resultados de turbidez en bruto anteriores, se mezclaron IgG (0,160 ml de 20 mg/ml) y TBP (2,00 ml, 0,30 mg/ml) y 0,04 ml de tampón GF (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0) y se dejaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se volvió visiblemente turbia durante la incubación.

- 55 La solución turbia se cargó en una columna de 1 ml compactada con el gel de biotina-agarosa. La columna se lavó con 7,5 ml de tampón de equilibrio, se recogieron 18 fracciones de 0,50 ml, antes de eluir la columna con 5 ml de tampón de elución (citrato de sodio 0,1 M, pH 3,5). El flujo continuo y el líquido de elución se registraron a 280 nm con el fin de estimar las áreas de pico.

Como en el ejemplo anterior, se recogieron las fracciones de elución y se analizaron mediante SDS-PAGE seguido de tinción con azul brillante de Coomassie. El análisis de las fracciones recogidas durante la elución mostró que la IgG pura compuesta de polipéptidos de cadena pesada (50 kDa) y cadena ligera (25 kDa) se eluyó de la columna.

La columna con TBP unido se usó para la captura y elución de IgG. En primer lugar, la columna se volvió a equilibrar como se ha descrito anteriormente. Se mezclaron IgG (0,160 ml de IgG 20 mg/ml) y tampón GF (2,04 ml) y se aplicaron a la columna, se lavaron y se eluyeron con el tampón de citrato de Na como anteriormente.

5 Esto se repitió ocho veces en la misma columna para detectar cualquier fuga de la molécula de TBP unida. El flujo continuo y el líquido de elución se volvieron a registrar a 280 nm con el fin de estimar las áreas de pico.

10 La siguiente tabla resume las áreas de pico de flujo continuo y elución de la purificación (a) en solución y (b) repetida en la columna.

	Área de pico de flujo continuo (mUA*ml)	Área de pico de flujo continuo	Área de pico de IgG (mUA*ml)	% de Área de pico de IgG
(a) en solución	512	64	286	36
(b) en columna, inyección 1	803	92	73	8
(b) en columna, inyección 2	807	92	71	8
(b) en columna, inyección 3	775	92	68	8
(b) en columna, inyección 4	782	92	69	8
(b) en columna, inyección 5	788	92	68	8
(b) en columna, inyección 6	779	92	66	8
(b) en columna, inyección 7	799	92	68	8
(b) en columna, inyección 8	693	91	66	9

15 La Figura 8 es un diagrama de bloques que compara las áreas de pico de IgG de elución de la purificación (a) en solución y (b) los picos de elución repetida de TBP unido a la columna.

Durante la elución, se recogieron fracciones de 1 ml y se analizaron mediante SDS-PAGE seguido de tinción con azul brillante de Coomassie. El análisis de las fracciones recogidas durante la elución mostró que la IgG pura compuesta de polipéptidos de cadena pesada (50 kDa) y cadena ligera (25 kDa) se eluyó de la columna.

20 Los resultados obtenidos ilustran claramente la relación entre la formación de complejo y la capacidad de purificación de IgG.

25 La capacidad de unión de IgG para la captura de TBP en solución fue 4 veces mayor en comparación con el mismo TBP inmovilizado en la columna. Los ciclos repetidos de captura-elución muestran que no hay fugas de TBP de la columna.

Ejemplo 8. Purificación por afinidad gradual en solución y en columna usando un tampón de potenciación

30 El experimento se realizó para demostrar que las moléculas de TBP pueden mezclarse con la molécula diana de IgG y un tampón de potenciación en solución puede formar complejos, aplicarse en una columna de biotina agarosa, lavarse y, mediante elución a pH bajo, eluyeron las moléculas diana.

La capacidad de unión para TBP unido al soporte se comparó con o sin un tampón de potenciación.

35 Se sometió a ensayo en primer lugar el conjugado de TBP purificado n.º 17 (aproximadamente 1,41 mg/ml) preparado mediante el método SPDP/SMCC en el ensayo de turbidimetría como se ha descrito anteriormente. Basándose en el ensayo de turbidimetría con el tampón de potenciación, se seleccionó la relación de TBP a diana donde la curva de respuesta a la dosis está llegando a una meseta.

40 Se hicieron dos diluciones de TBP con el (a) tampón GF patrón y con el (b) tampón de potenciación que contenía PEG (Dako, S2307).

Se mezclaron TBP (0,475 ml) y tampón (0,475 ml). Cada mezcla se mezcló adicionalmente con IgG (0,20 ml, 20 mg/ml) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.

45 Durante la incubación, la mezcla (b) con el tampón de potenciación se volvió turbia, mientras que (a) permaneció transparente.

5 Las mezclas de TBP - IgG se cargaron en dos columnas de biotina agarosa idénticas preparadas como se ha descrito anteriormente. Como en el experimento anterior, las dos columnas se lavaron y la IgG se eluyó con el tampón de citrato de Na. El flujo de líquido de la columna se registró a 280 nm con el fin de controlar las áreas de pico.

10 Las dos columnas con TBP unido se usaron para la captura y la elución de IgG. La columna se volvió a equilibrar como se ha descrito anteriormente. Se aplicaron mezclas de IgG (0,20 ml de IgG 20 mg/ml) y tampón GF (0,95 ml) o tampón de potenciación que contenía PEG (Dako, S2307, 0,95 ml), respectivamente, a cada columna, se lavaron y se eluyeron con el tampón de citrato de Na como anteriormente. Las áreas pico se midieron registrando la absorbancia UV a 280 nm del flujo de líquido de la columna.

15 La siguiente tabla resume las áreas de pico de elución para la purificación de IgG con TBP en solución y unidos a la columna con el GF y el tampón de potenciación, respectivamente.

	TBP en solución	TBP inmovilizado
	Área	Área
	(mUA*ml)	(mUA*ml)
Tampón patrón GF	71	53
Tampón de potenciación	397	81

Usando el tampón GF, la cantidad de IgG unida y eluida fue aproximadamente un 33 % mayor para el TBP en solución en comparación con el TBP unido a la columna.

20 Además, en comparación con el tampón GF, el tampón de potenciación tuvo cierto efecto positivo sobre la cantidad de IgG unida y eluida del TBP unido a la columna.

Más significativamente, usando el tampón de potenciación, la cantidad de IgG unida y eluida fue casi 4 veces mayor para el TBP en solución en comparación con el TBP unido a la columna.

25 **Ejemplo 9. Purificación por afinidad en solución, centrifugación y retirada de TBP**

El experimento ilustra la mezcla de moléculas de TBP con la molécula diana IgG y el tampón de potenciación en solución, la separación del complejo formado mediante centrifugación y la retirada del TBP en la columna.

30 En primer lugar se prepara una columna de biotina agarosa como se ha descrito anteriormente, seguido de un lavado adicional con el tampón de elución de citrato de Na.

35 El conjugado de TBP n.º 17 (aproximadamente 1,41 mg/ml, 0,95 ml), la IgG (0,40 ml, 20 mg/ml) y el tampón de potenciación (Dako, S2307, 0,95 ml) se mezclan durante 10 segundos en un tubo de centrifuga de polipropileno (14 ml) con fondo cónico. La solución se vuelve turbia después de unos minutos. El tubo se deja reposar a temperatura ambiente durante 60 minutos. El tubo se centrifuga (10000 rpm, 5 minutos, centrifuga Ole Dick tipo 157, Copenhague) y se retira el sobrenadante.

40 El sedimento se lava en tampón de precipitación y se vuelve a suspender con tampón de elución de citrato de Na (2 ml) mezclándolo con una espátula delgada y se agita hasta que la solución sea transparente. La solución transparente se añade a la columna y el flujo continuo del líquido se controla mediante el detector UV y se recoge el pico que contiene la diana.

45 La solución de diana recogida se ajusta a pH 7.

Se usa una muestra para la identificación del polipéptido de cadena pesada (50 kDa) y cadena ligera (25 kDa) de IgG mediante SDS-PAGE seguida de tinción con azul brillante de Coomassie.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la purificación de una molécula diana, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una molécula diana y una población de polipéptidos de unión a la diana (TBP), en solución durante un tiempo suficiente para permitir la formación de complejo; y (b) aislar la diana del complejo de (a) mediante etapas de purificación posteriores, en donde el aislamiento de la diana del complejo se obtiene capturando los complejos diana-TBP sobre un soporte, seguido de la elución de la molécula diana del soporte mientras el TBP permanece inmovilizado en el soporte, en donde (i) los polipéptidos de unión a la diana tienen al menos dos funcionalidades de unión; una primera funcionalidad de unión hacia la diana y una segunda funcionalidad de unión hacia un ligando de captura comprendido en un soporte; y (ii) la primera funcionalidad de unión comprende al menos dos sitios de unión para la diana y la diana comprende al menos dos sitios de unión para el TBP, en donde la molécula diana es una biomolécula y en donde dicha biomolécula es una proteína, un péptido, un oligopéptido, una lipoproteína, una apolipoproteína, una proteína de fósforo o una glucoproteína.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la población de TBP comprende solo TBP idénticos.
3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la población de TBP comprende TBP que son estructural y/o funcionalmente diferentes.
4. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formación de complejo se realiza en presencia de un tampón promotor de complejo.
5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el tampón comprende reactivos para i) disminuir la actividad del agua, ii) estabilizar el pH y iii) evitar interacciones de proteínas inespecíficas o aleatorias y la precipitación, y aumentar la solubilidad general de las proteínas.
6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde los reactivos para disminuir la actividad del agua comprenden sulfato de amonio, ácido caprílico, dextrano, polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), ácido hialurónico, quitosano y sus ésteres, polioles globulares como ficoll y polivinilpirrolidona (PVP).
7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el PEG comprende PEG al 1-10 % (p/v) con un peso molecular promedio de 1.000 a 10.000 Da.
8. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en donde el tampón comprende detergentes o tensioactivos neutros, aniónicos, catiónicos y de copolímero de bloque.
9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el tampón comprende Tween 20, Tween 40, familia de los plurónicos o detergentes NP40 en concentraciones inferiores al 2 % (p/v).
10. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-9, en donde los agentes estabilizadores del pH comprenden tampones de fosfato, tampones de citrato, tampones de borato y tampones Good.
11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde los tampones Good se seleccionan entre el grupo que consiste en tampones de Tris, Hepes y MES a pH 5-8.
12. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se optimiza la relación de molécula diana a TBP para permitir la formación óptima de complejos.
13. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la primera funcionalidad de unión comprende al menos tres sitios de unión para la diana y/o la diana comprende al menos tres sitios de unión para el TBP.
14. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los al menos dos o tres sitios de unión comprendidos en la primera funcionalidad de unión son funcionalmente diferentes.
15. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la relación de molécula diana a TBP se optimiza midiendo la formación de complejo.
16. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formación de complejo se mide mediante ensayos espectrofotométricos.
17. El proceso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la formación de complejo se mide mediante turbidimetría o nefelometría.
18. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la relación de molécula diana a TBP se optimiza y dicha relación se monitoriza y se controla durante la etapa de formación de complejo.

19. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en donde el aislamiento de la diana del complejo se obtiene mediante precipitación o centrifugación, seguidas de disolución del complejo, captura del TBP sobre un soporte sólido y recogida de la molécula diana.

5

20. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formación de complejo es equivalente a un cambio en la densidad óptica de al menos 0,1 cuando se mide mediante turbidimetría.

Conjugado	A	B	C	D	E	F	G	H
N.º	mg/ml	eq.	Grado de sub	mg/ml	eq.	eq.	mg/ml	min.
1	10	5,0	1,3	15	5,0	1	2,0	120
2	10	5,0	1,3	15	5,0	2	4,1	120
3	10	5,0	1,4	15	5,0	1	2,0	120
4	10	5,0	1,4	15	5,0	1	2,0	30
5	10	2,5	0,6	15	2,5	1	2,0	30
6	10	2,5	0,6	15	2,5	1	2,0	15
7	10	2,5	0,7	15	2,5	1	1,3	30
8	10	2,5	0,7	15	2,5	1	0,7	30
9	10	2,5	0,7	15	2,5	2	2,7	30
10	10	2,5	0,7	15	2,5	2	1,3	30
11	10	5,0	1,2	15	5,0	1	2,1	120
12	20	10,0	4,1	20	10,0	1	2,0	120
13	20	10,0	4,1	20	10,0	2	4,0	120
14	20	10,0	4,1	20	10,0	3	6,0	120
15	15	5,0	2,1	15	5,0	3	6,0	120
16	15	2,5	0,9	15	2,5	3	6,0	120
17	10	10,0	6,0	15	10,0	1	2,0	120

Fig. 1

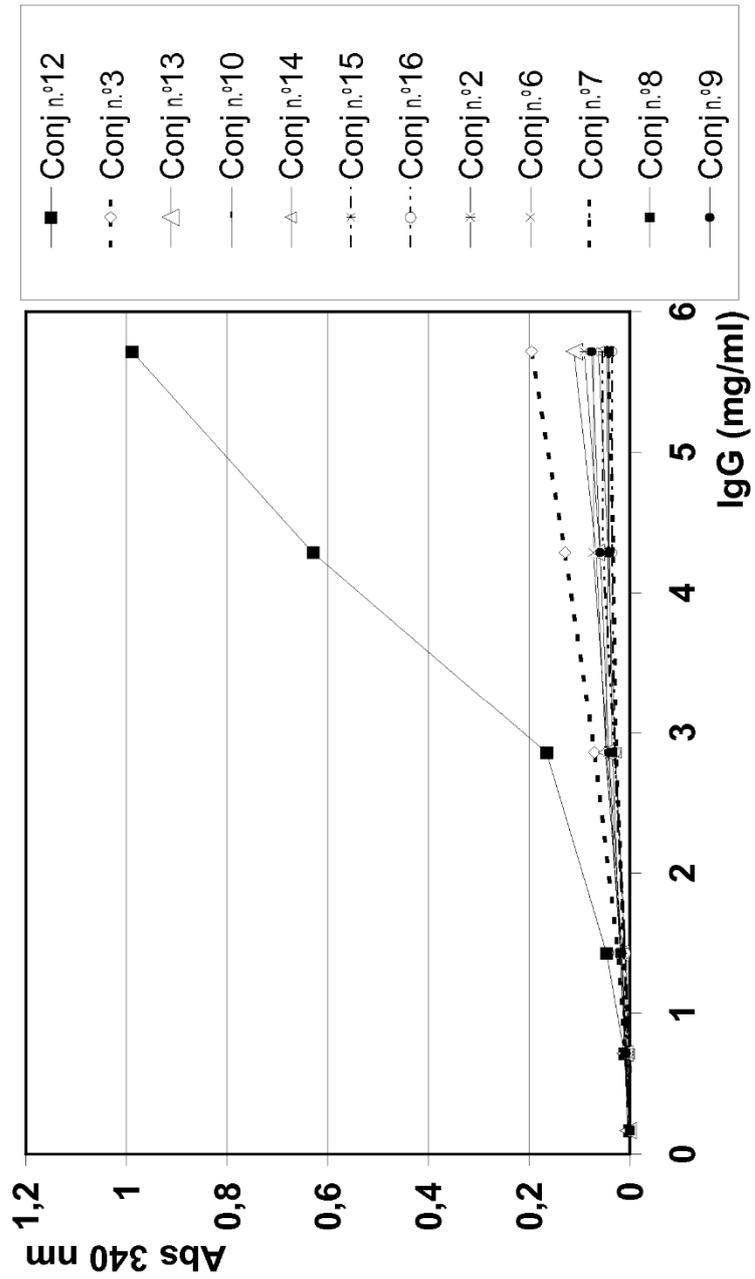


Fig. 2

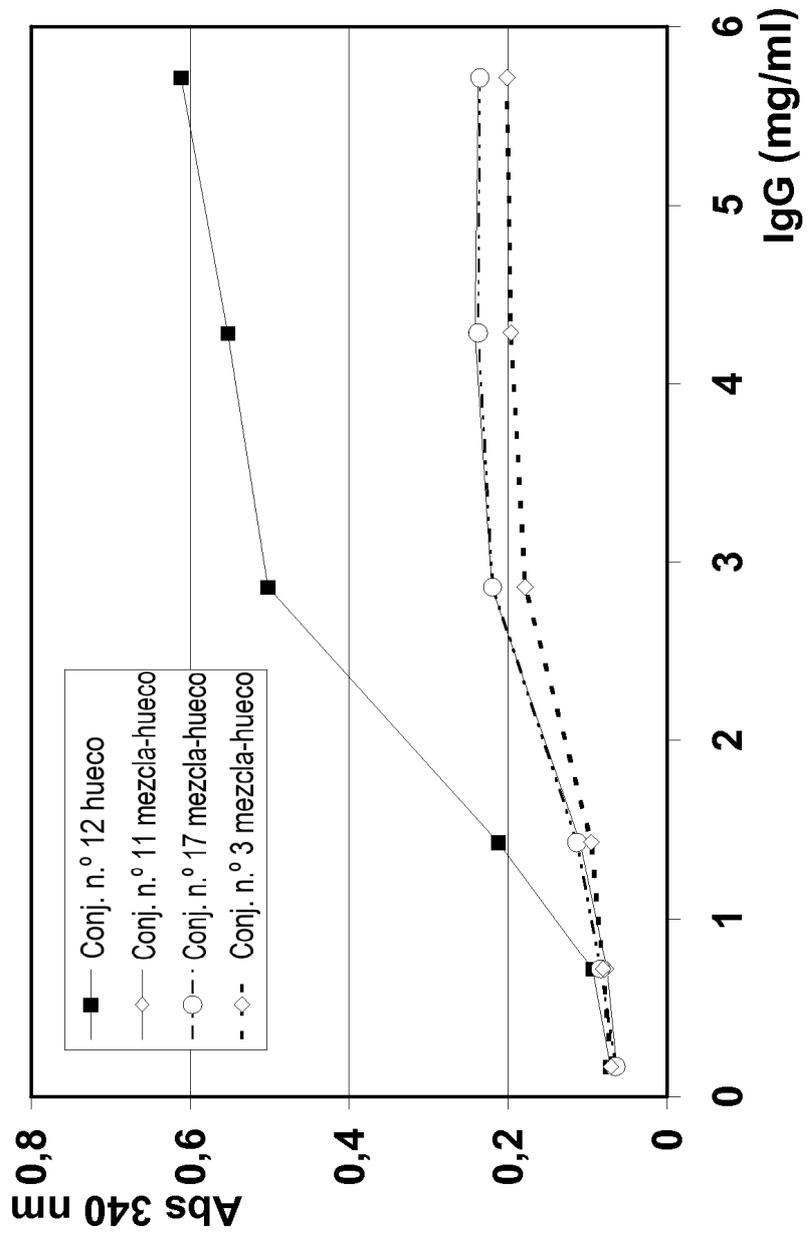


Fig. 3

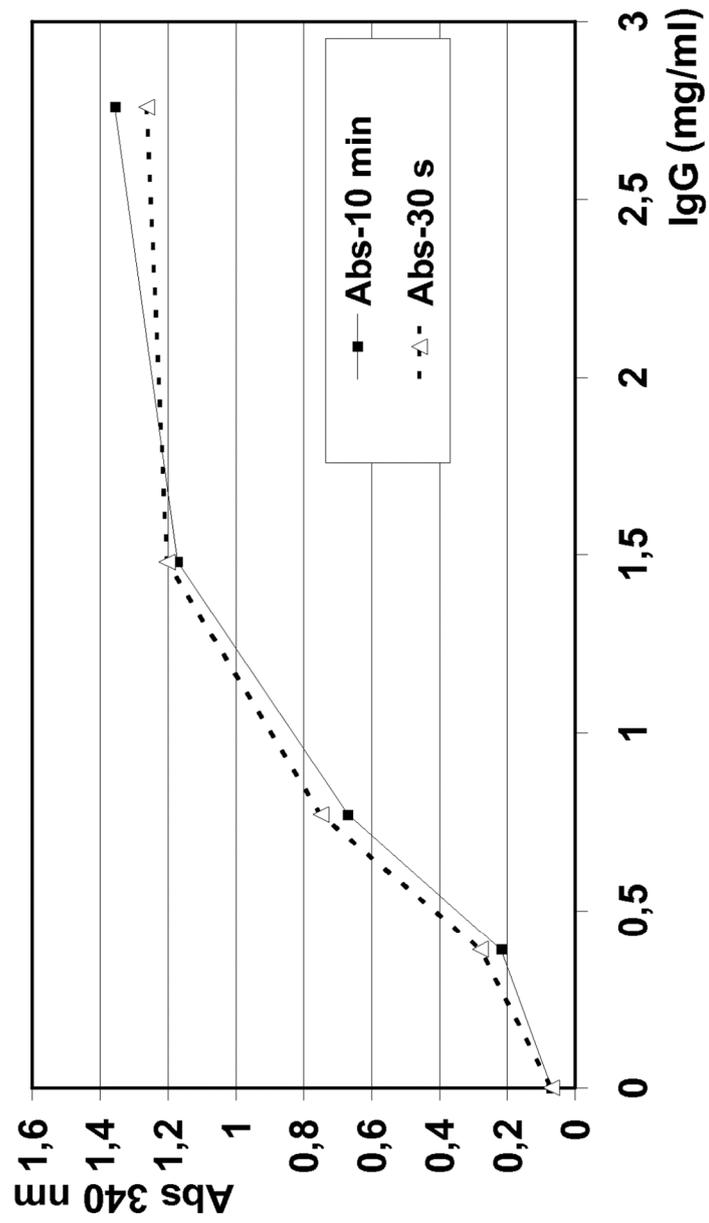


Fig. 4

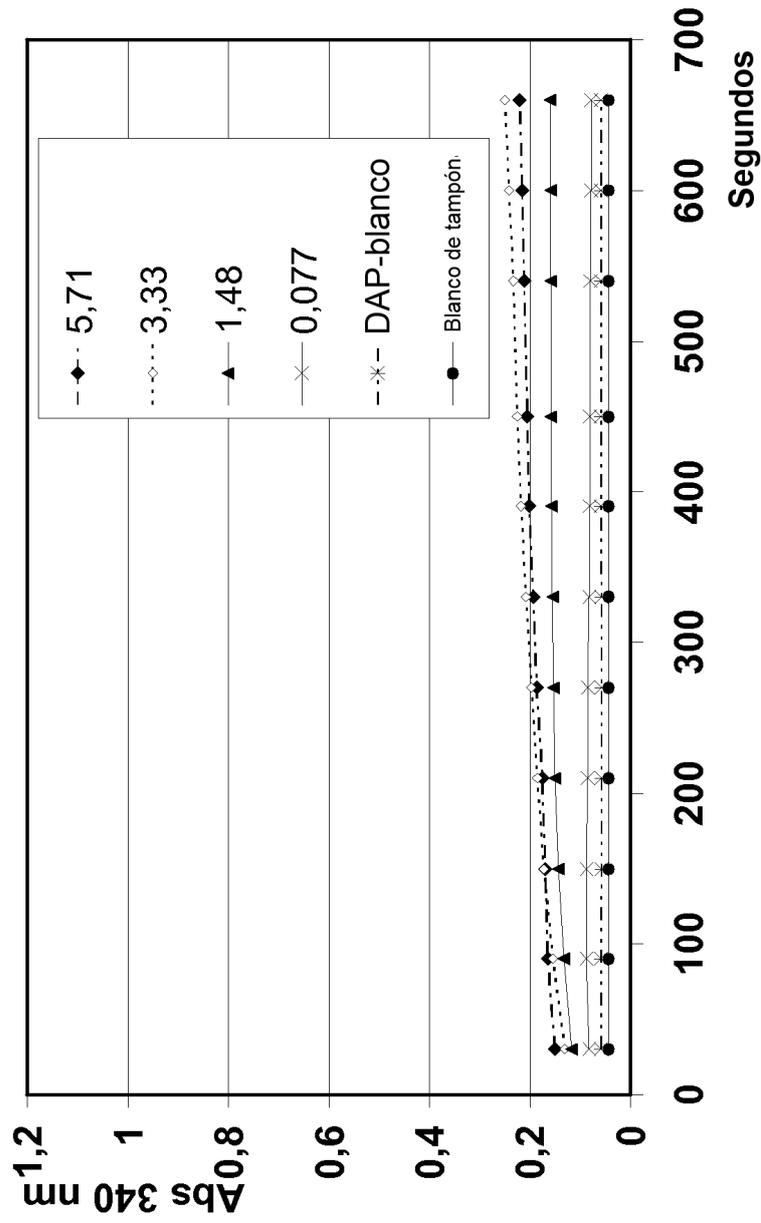


Fig. 5

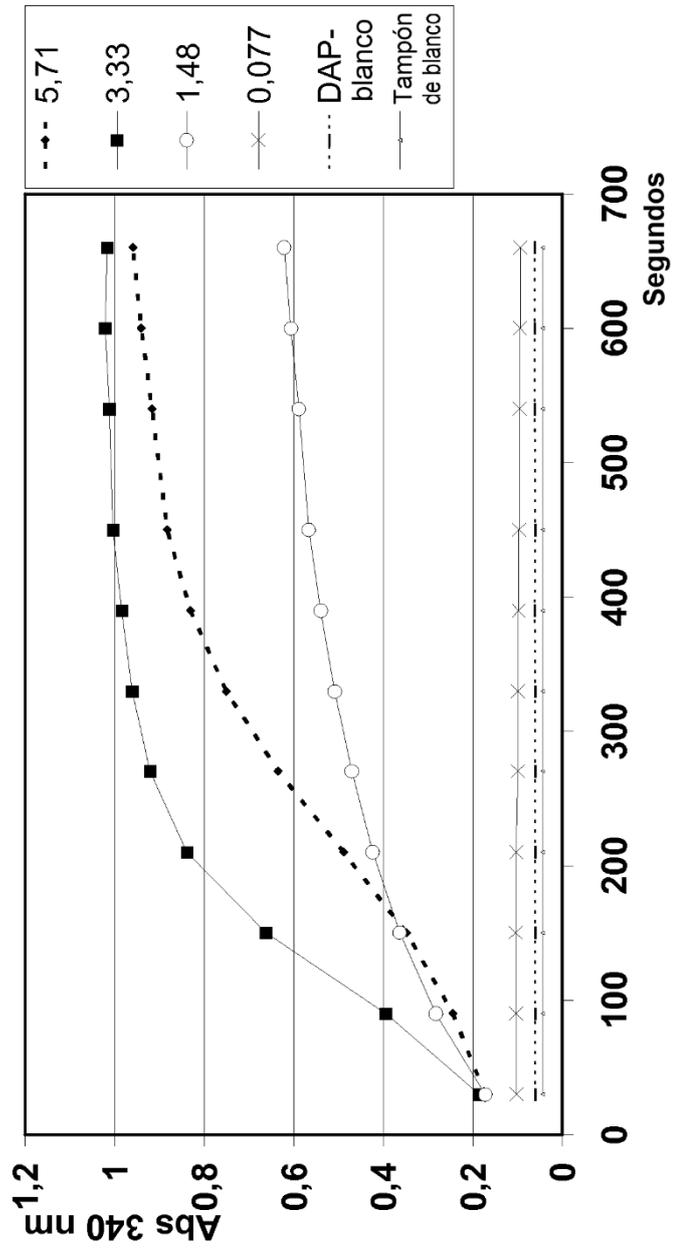


Fig. 6

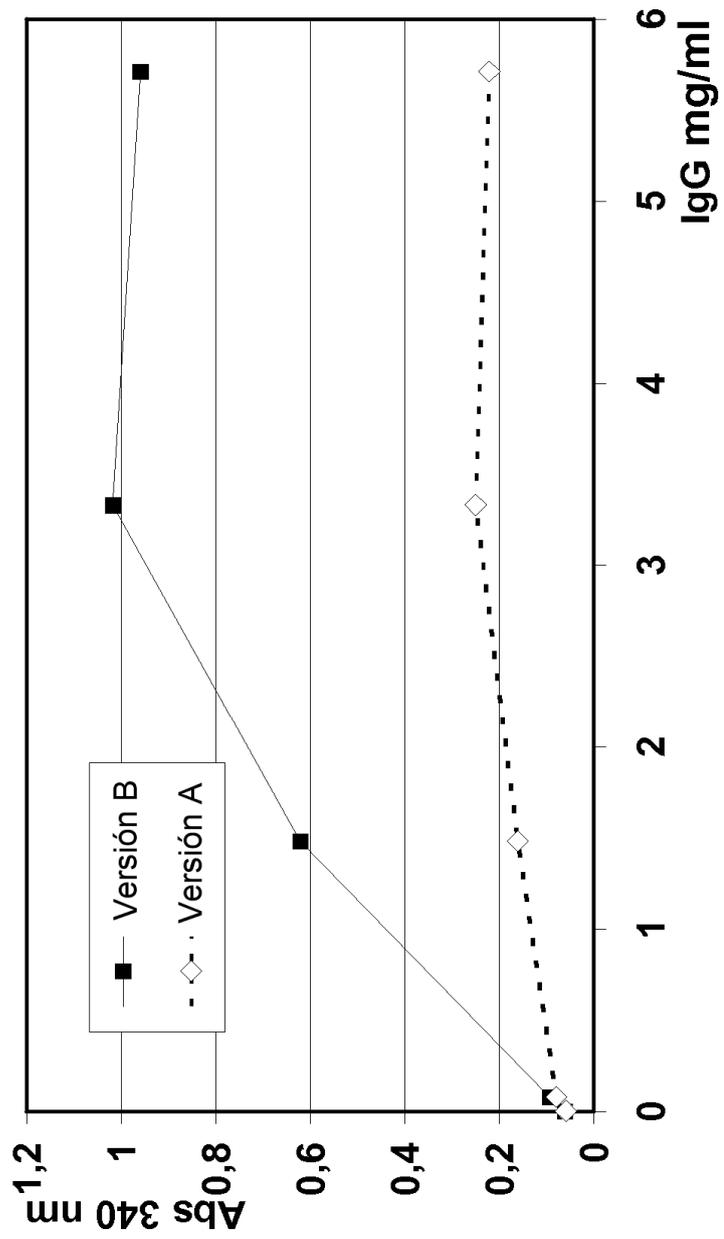


Fig. 7

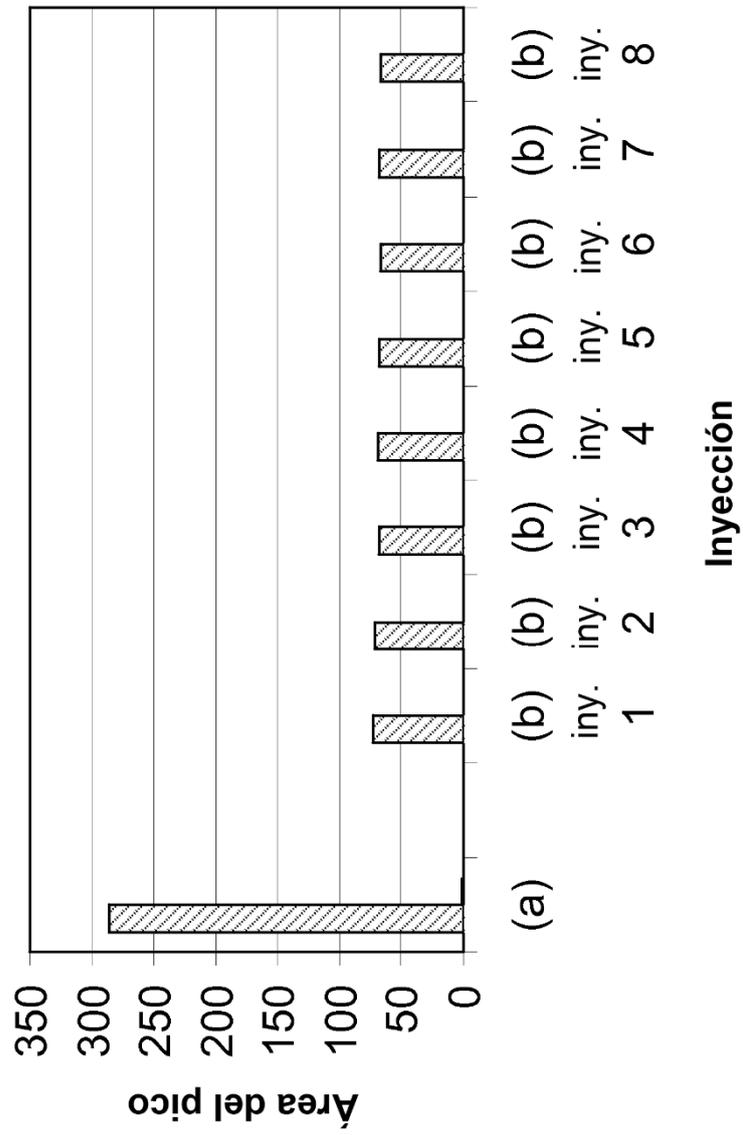


Fig. 8