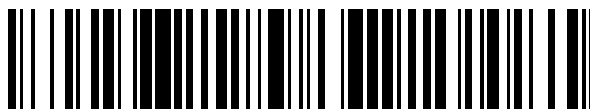


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 638**

51 Int. Cl.:

G01N 1/40 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2015** **PCT/EP2015/000361**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015** **WO15131978**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2015** **E 15706374 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020** **EP 3114455**

54 Título: **Purificación de anticuerpos robusta**

30 Prioridad:

04.03.2014 US 201461947761 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.09.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SKUDAS, ROMAS;
JOEHNCK, MATTHIAS;
EDELMANN, BIANCA;
BRAUN, SIMON;
KOZLOV, MIKHAIL;
STONE, MATTHEW T. y
GALYPEAU, KEVIN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 784 638 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

Purificación de anticuerpos robusta

La presente invención se refiere a un método para la separación de proteínas de células huésped (HCP), fragmentos de anticuerpo y sustancias de bajo peso molecular a partir de disoluciones que contienen anticuerpos.

5 Estado de la técnica

Proteína A y purificación de anticuerpos monoclonales

Dado que se usan anticuerpos (AcM) para aplicaciones farmacéuticas, se requieren en purezas excepcionalmente altas [A. Jungbauer, G. Carta, en: Protein Chromatography, Process Development and Scale-Up; WILEY-VCH Verlag, Weinheim (Alemania) 2010].

10 La proteína A es inicialmente una proteína de superficie de 56 kDa originalmente encontrada en la pared celular de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Está codificada por el gen spa y su regulación está controlada mediante topología de ADN, osmolaridad celular y un sistema de dos componentes denominado ArIS-ArIR. Se ha encontrado uso en investigación bioquímica debido a su capacidad para unirse a inmunoglobulinas. Está compuesta originalmente por cinco dominios de unión a Ig homólogos que se pliegan para dar un haz de tres hélices. Cada dominio puede unirse a proteínas de muchas especies de mamíferos, lo más notablemente a IgG. Se une a la cadena pesada dentro de la región Fc de la mayoría de las inmunoglobulinas y también dentro de la región Fab en el caso del la familia de VH3 humana. Mediante estas interacciones en suero, donde las moléculas de IgG se unen en la orientación equivocada (con respecto a la función de anticuerpo normal), las bacterias alteran la opsonización y fagocitosis.

20 En general, se emplean cultivos de células de mamífero para fabricar la mayoría de los anticuerpos monoclonales (AcM) terapéuticos actualmente comercializados. La producción de estos anticuerpos de fármacos comienza normalmente en un biorreactor que contiene una suspensión de células de ovario de hámster chino (CHO) que secretan el anticuerpo en el fluido extracelular. Después se someten los anticuerpos resultantes a una serie de procedimientos incluyendo aclaración, filtración y purificación que retira células, residuos celulares, proteínas de células huésped (HCP), lípidos, ADN, virus, bacterias, agregados de anticuerpos, etc. Esta serie de procedimientos se denomina con frecuencia procedimiento aguas abajo (DSP).

25 El DSP más habitualmente empleado incluye una o dos etapas de purificación por cromatografía de unión-elución seguidas por una o dos etapas de pulido de flujo a través. Los procedimientos de purificación aguas abajo típicos emplean columnas empaquetadas rellenas con medios de cromatografía basados en perlas porosas o dispositivos basados en membrana. Estas operaciones unitarias se emplean en serie y cada una se dirige a aclarar una impureza particulada en un modo o bien de pulido de flujo a través o bien de captura de unión/elución. Uno de los objetivos primarios de los medios de pulido es reducir la concentración de impurezas (por ejemplo HCP hasta < 10 ppm con referencia a la concentración de AcM).

30 En resumen, un procedimiento de purificación de anticuerpos típico incluye una etapa de captura por afinidad a proteína A inicial seguida por una o más etapas de pulido de intercambio iónico, cuyo propósito es reducir el nivel de una o más impurezas críticas tales como, por ejemplo, proteína de célula huésped (HCP), fragmentos de anticuerpo y otras sustancias de bajo peso molecular. Los fragmentos de anticuerpo son especialmente difíciles de separar a partir de anticuerpos dado que tienen propiedades similares, especialmente fragmentos que contienen FC. Generalmente, estos últimos no se separan usando cromatografía de proteína A.

35 En general, se realizan etapas de purificación de anticuerpos adicionales (por ejemplo CEX, AEX) después de la etapa de captura de proteína A en determinadas condiciones para retirar las impurezas restantes. Esto requiere numerosos ajustes de disolución de contención de anticuerpos antes de esas etapas de purificación (por ejemplo, ajuste de pH, ajuste de conductividad). Además, estos desplazamientos de pH y conductividad imponen tensiones sobre la molécula de interés, y se generan impurezas relacionadas con anticuerpos (por ejemplo agregados de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo).

40 Recientemente, ha habido una tendencia apreciable en la industria por intentar reducir el número de etapas de purificación manteniendo los atributos de calidad del producto. Además, el uso de técnicas para obtener un título de expresión superior usando biorreactores es una tendencia al alza en la industria. La combinación de estas dos tendencias ha dado como resultado la carga de más producto en una columna, dando así como resultado una carga aumentada de medios de cromatografía bastante caros así como una pureza de producto inferior, ambos de los cuales son indeseables.

45 Con el fin de mejorar la selectividad de la purificación cromatográfica de productos proteicos deseados tales como anticuerpos o fragmentos de proteína especiales, se han desarrollado diversos materiales cromatográficos en paralelo con la alteración de métodos de purificación. Especialmente, derivatizaciones específicas de superficies de materiales de separación deben conducir a una separación más selectiva de impurezas no deseadas a partir de los productos deseados en medios de cultivo celular aclarado. Pero estas derivatizaciones de superficie especiales y complejas hacen

que la producción de estos materiales de cromatografía sea mucho más cara que los productos comercialmente disponibles, de modo que su uso en purificaciones a escala industrial es menos atractivo.

Otros desarrollos en el campo de materiales de cromatografía se dirigieron a materiales de separación basados en sustratos orgánicos, dado que materiales comercialmente disponibles, basados en materiales de sílice, se ven generalmente afectados en un medio básico y pierden estabilidad, particularmente durante la regeneración.

Pueden hacerse funcionar fases estacionarias basadas en polímeros orgánicos a lo largo de un amplio intervalo de condiciones de pH. Por tanto, las resinas poliméricas pueden limpiarse de manera agresiva en condiciones de pH alto. Pero las fases estacionarias poliméricas actuales son algo compresibles en las condiciones de presión media a alta usadas en separaciones de biomoléculas de alta resolución.

Los copolímeros macroporosos convencionales producidos a partir de la polimerización en suspensión de mezclas que contienen divinilbenceno (DVB) en presencia de un no disolvente representan polímeros que tienen un amplio intervalo de distribuciones de tamaño de poro y áreas de superficie. Tales perlas de polímero se dan a conocer, por ejemplo, en el documento US 4.686.269. Estas perlas de polímero se preparan a partir de monómeros vinil-aromáticos, que tienen diámetros de partícula promedio de desde 0,5 hasta 50 μm . Pero no son rígidas en condiciones de alta presión habitualmente usadas en columnas de cromatografía a escala de producción. La rigidez de perlas de polímero usadas en cromatografía es esencial porque proporciona, junto con la fase estacionaria de polímero poroso, las características necesarias de presión y flujo durante la separación. J KEVIN *et al.* dan a conocer un método para la purificación de anticuerpos monoclonales usando resinas de HIC (resinas de cromatografía de interacción hidrófoba) de Tosoh en una presentación en PowerPoint [en: "Purification of monoclonales antibodies using new pore size optimized HIC resins"; BIOPROCESS INTERNATIONAL SHOW & EXHIBITION 2006, 6 de noviembre de 2006 (06-11-2006), páginas 1 - 18]. Las resinas de HIC usadas son "Toyopearl PPG-600M", que se basan en un material a base de polimetacrilato con un tamaño de poro de 75 nm unido a grupos polipropilenglicol. Este material muestra grupos polipropilenglicol como ligandos en su superficie, que interaccionan en disolución con sus grupos OH y no sólo con partes hidrófobas. Los resultados comentados conducen a la constatación de que este material de separación tiene que optimizarse adicionalmente para la purificación de AcM. Además, en este caso, los anticuerpos interaccionan con la resina de cromatografía (HIC), mientras que los constituyentes no deseados no lo hacen.

En el documento WO 03/102132 A2 [Genentech Inc [EE.UU.], publicado: 11 de diciembre de 2003] se da a conocer un método complejo para la separación de proteínas a partir de medios de cultivo celular, en el que la disolución que comprende anticuerpo tiene que pasar por al menos tres etapas de cromatografía (cromatografía de intercambio catiónico, aniónico y cromatografía de interacción hidrófoba) y una filtración de flujo tangencial de alta resolución (HPTFF) para aislar la proteína deseada en una pureza que contiene menos de 100 ppm de HCP.

Objetivo

El problema que va a resolverse es la necesidad de una etapa de purificación de anticuerpos robusta y fiable, que pueda aplicarse de manera fácil y eficaz en una amplia gama de condiciones en un modo de flujo a través, en la que se reduzca el nivel de impurezas críticas, tales como HCP y fragmentos de anticuerpo.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método para la separación de proteínas de células huésped (HCP), fragmentos de anticuerpo y sustancias de bajo peso molecular a partir de disoluciones que contienen anticuerpos, en el que una disolución que contiene anticuerpos se pone en contacto con un material de cromatografía hidrófobo durante un periodo de tiempo adecuado mediante lo cual los anticuerpos permanecen predominantemente en disolución y las HCP, los fragmentos de anticuerpo y las sustancias de bajo peso molecular se adsorben mediante el material cromatográfico.

En detalle, el material cromatográfico hidrófobo es particulado y está compuesto por poliestireno o poli(etil)estireno que está reticulado con copolímero de divinilbenceno y dimetacrilato de etilenglicol en una razón de desde el 98 : 2 hasta el 10 : 90% en peso.

Con el fin de llevar a cabo la retirada y separación de proteínas de células huésped, fragmentos de anticuerpo y sustancias de bajo peso molecular a partir del anticuerpo deseado, una disolución acuosa de cultivo celular aclarado, que tiene un valor de pH en el intervalo de 5-9 y una conductividad en el intervalo de 2-50 mS/cm, se pone en contacto con el material de cromatografía hidrófobo. Preferiblemente la disolución acuosa se hace pasar a través a una velocidad de flujo en el intervalo de 150 - 1000 cm/min, preferiblemente en el intervalo de 300 - 900 cm/min. En una realización particularmente preferida la separación de proteínas de células huésped (HCP), fragmentos de anticuerpo y sustancias de bajo peso molecular se procesa después de la etapa de unión por afinidad a proteína A. Si se requiere, la secuencia de purificación incluye un tratamiento con resina de intercambio iónico.

Habitualmente la separación se procesa usando materiales de separación cromatográfica hidrófobos, particulados, que tienen diámetros medios de partícula en el intervalo de 10 μm a 600 μm , preferiblemente en el intervalo de 20 μm a 150 μm , lo más preferiblemente en el intervalo de 20 μm a 63 μm . Las perlas de polímero hidrófobo porosas adecuadas de este tamaño tienen preferiblemente tamaños de poro en el intervalo de 4 - 500 nm, más preferiblemente en el intervalo de 10 - 30 nm, lo más preferido en el intervalo de 13 nm a 25 nm.

Tal como se indicó anteriormente, la secuencia de purificación puede incluir al menos un tratamiento con una resina de intercambio iónico, que es preferiblemente específica para la separación de proteína A. Un tratamiento combinado con tales resinas de intercambio iónico y un tratamiento con perlas de polímero hidrófobo porosas da ventajosamente como resultado un agotamiento de hasta <10 ng de HCP y una retirada simultánea de proteína A lixiviada. Se obtienen efectos de limpieza particularmente buenos en este caso si las partículas de polímero hidrófobo consisten en resina de vinilbenceno reticulado, poli(etil)estireno-divinilbenceno o en poli(etil)estireno-divinilbenceno-dimetilacrilato de etilenglicol.

El objeto de la presente invención es, en particular, el uso de materiales de separación cromatográfica hidrófobos que tienen tamaños de poro en el intervalo de 4 nm a 500 nm, preferiblemente en el intervalo de 10 nm - 30 nm, lo más preferiblemente en el intervalo de 13 nm a 25 nm para la separación de proteínas de células huésped (HCP), fragmentos de anticuerpo y sustancias de bajo peso molecular a partir de disoluciones que contienen anticuerpos. Los materiales de separación cromatográfica hidrófobos usados de la presente invención están compuestos preferiblemente por resina de vinilbenceno reticulado, etilestireno reticulado, poliestireno/polietilestireno-divinilbenceno o por poliestireno/polietilestireno-divinilbenceno-dimetilacrilato de etilenglicol. En una realización especialmente preferida las perlas de polímero hidrófobo rígidas usadas descritas en el presente documento tienen diámetros medios de partícula en el intervalo de 10 µm a 600 µm, preferiblemente en el intervalo de 20 µm a 150 µm, lo más preferiblemente en el intervalo de 20 µm a 63 µm, y tamaños de poro en el intervalo de 4 nm a 500 nm, preferiblemente en el intervalo de 10 nm - 30 nm, lo más preferiblemente en el intervalo de 13 nm a 25 nm.

Descripción detallada de la invención

En diversos experimentos descritos en el presente documento se encontró que materiales de interacción hidrófobos porosos tales como perlas aromáticas de poli(di)vinilo porosas son útiles para la purificación de anticuerpos a gran escala a partir de disoluciones de cultivo celular. Estas etapas de purificación pueden realizarse o bien aguas arriba o bien aguas abajo de una etapa de cromatografía de captura con el fin de reducir el nivel de una o más impurezas presentes en una muestra (por ejemplo, una disolución de cultivo celular aclarado) que contiene una proteína de interés.

Con este fin, se pone la disolución de cultivo celular aclarado en contacto con el material de interacción hidrófobo, por ejemplo en contacto con perlas de poliestireno hidrófobo porosas, y se incuba durante un determinado periodo de tiempo con el fin de reducir selectivamente reduce el nivel de sustancias de bajo peso molecular. Mediante este procedimiento, es posible reducir selectivamente fragmentos de anticuerpo y HCP no deseados a partir de la disolución de cultivo que contiene el anticuerpo de interés. Dicho material de interacción hidrófobo es especialmente adecuado para someterse a disoluciones de anticuerpos tras captura con proteína A y para reducir selectivamente el nivel de sustancias de bajo peso molecular (por ejemplo fragmentos de anticuerpo, HCP) poniendo en contacto una disolución de cultivo celular aclarado con el material durante un periodo de tiempo adecuado. Para llevar a cabo este procedimiento de purificación, el material de interacción hidrófobo (por ejemplo, perlas de poliestireno) se incorpora en una o varias columnas de cromatografía u otros dispositivos, tales como alojamientos de filtro y similares. Después se usan estas columnas empaquetadas para procedimientos de purificación de proteínas en un modo de flujo a través, mediante lo cual sustancias de bajo peso molecular, tales como fragmentos de anticuerpo y HCP de la disolución de cultivo, interaccionan con el material de interacción poroso, hidrófobo, durante el flujo a través de la columna y se reduce el nivel de sustancias de bajo peso molecular (por ejemplo fragmentos de anticuerpo, HCP). En este caso, se obtienen buenos resultados de purificación cuando se ajusta la velocidad de flujo para estar en el intervalo de 150 cm/min – 1000 cm/min, y especialmente entre 300 – 900 cm/min.

Además, en experimentos descritos en el presente documento, se encontró que pueden lograrse buenos resultados de purificación si el pH del caldo de cultivo aclarado se ajusta para estar en un intervalo de entre 2 y 11, y preferiblemente en el intervalo de 3 a 9.

Al mismo tiempo, se ha demostrado que es ventajoso si la conductividad de la disolución está en el intervalo de 1 mS/cm - 50 mS/cm, y especialmente en el intervalo de entre 2 - 50 mS/cm.

Tal como se demuestra mediante los experimentos en el presente documento, se encontró que era especialmente sorprendente que pueden lograrse altas purezas de los medios de cultivo celular aclarado mediante el uso de materiales de interacción hidrófobos en forma de pequeñas perlas de polímero porosas. En algunas realizaciones este material puede consistir principalmente en poliestireno o polietilestireno y puede estar reticulado mediante una mezcla de monómeros hidrófobos e hidrófilos, por ejemplo divinilbenceno (DVB) y dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA).

Las perlas de polímero porosas se producen normalmente mediante polimerización en suspensión. Pueden producirse en un procedimiento, que es por ejemplo similar al dado a conocer en el documento US 4.382.124 y en el que se introduce porosidad en las perlas de copolímero mediante polimerización en suspensión en presencia de un formador de poros (también conocido como “agente de extensión de fase” o “agente de precipitación”), que es un disolvente para el monómero pero un no disolvente para el polímero. Los polímeros porosos convencionales, tales como los preparados según el documento US 4.382.124, abarcan normalmente el uso de una amplia gama de tipos de formador de poros, concentraciones de formador de poros con respecto a la fase de monómero, tipos de monómero, tipos de monómero de reticulación, niveles de agente de reticulación, iniciadores de polimerización y concentraciones de iniciador. Sin embargo, la presente invención se basa en el hallazgo inesperado de que cuando la razón de monómeros hidrófobos

está en un intervalo especial, estas perlas de polímero son especialmente adecuadas y eficaces en la purificación de anticuerpos a partir de líquidos de cultivo celular.

Sin desear limitarse a la teoría, se cree que, en el caso de la presente invención, la capacidad aumentada para moléculas diana se logra principalmente cuando se altera la matriz de polímero aumentando las proporciones contenidas de moléculas hidrófobas en el polímero. Esta alteración se realizó teniendo en cuenta el equilibrio de los monómeros de construcción de polímero y de la cantidad de formadores de poros y de niveles de agente de reticulación que en conjunto influyen en los parámetros de porosidad, rigidez y capacidad de unión de moléculas diana.

Sorprendentemente, puede lograrse una separación significativamente mejorada de HCP mediante estas perlas de polímero hidrófobo porosas abiertas seleccionadas. La estructura porosa permite una rápida difusión de moléculas al interior y al exterior de la matriz de polímero, y debido a la porosidad de las perlas de polímero hay una gran área de superficie disponible para la interacción con proteínas e impurezas no deseadas contenidas en el medio de cultivo celular. Por tanto, estos materiales son muy eficaces en la separación de una biomolécula en una fase estacionaria. La mayoría de las fases estacionarias de cromatografía de fase inversa poliméricas, comerciales, modernas, parecen estar diseñadas alrededor de estos criterios, y se usan en condiciones de presión inferior, sin embargo, en condiciones de presión superior (normalmente en el intervalo de 10 a 100 bar) estos materiales son compresibles. Afortunadamente, las perlas de polímero según la presente invención tienen una rigidez aumentada y al mismo tiempo tienen una alta porosidad, proporcionando de ese modo una alta capacidad para la difusión dentro de partículas.

Las perlas de polímero hidrófobo porosas usadas en la presente invención son útiles para la retirada de proteínas de células huésped (HCP), fragmentos de anticuerpo y sustancias de bajo peso molecular a partir de disoluciones que contienen anticuerpos monoclonales poniendo en contacto la disolución con las perlas de polímero en una columna de cromatografía líquida que tiene un diámetro que oscila entre 1 y 100 cm, preferiblemente en el intervalo de 5 a 50 cm, en las que la columna se hace funcionar a presiones de hasta 100 bar, y preferiblemente a una presión que oscila entre 0,2 y 80 bar. Normalmente, las columnas a escala preparativa están en el intervalo de 10 a 50 cm y se hacen funcionar a presiones en el intervalo de 0,2 a 80 bar.

Las perlas de polímero porosas según la presente invención son normalmente perlas de copolímero esféricas que tienen un diámetro de tamaño de partícula promedio de hasta 200 μm , que es el tamaño típico para perlas de polímero útiles para la separación y purificación de biomoléculas mediante cromatografía de líquidos de fase inversa de alta resolución (tal como en columnas que tienen un diámetro que oscila entre 1 y 100 cm).

En general, se ha encontrado que los materiales de separación porosos son particularmente eficaces cuando tienen diámetros de tamaño de partícula promedio (d_{50}) en el intervalo de 10 - 600 μm , preferiblemente en el intervalo de 20 - 150 μm , mientras que se ha mostrado que tales materiales que tienen tamaños de partícula promedio en el intervalo de 20 - 63 μm son particularmente eficaces.

Tales materiales de separación hidrófobos, preferiblemente perlas de poliestireno, parecen ser adecuados para el efecto de separación deseado, que tienen un tamaño de poro en el intervalo de 4 - 500 nm. Experimentos de purificación han mostrado que materiales de interacción hidrófobos, que tienen tamaños de poro promedio de entre 10-30 nm, conducen a resultados de separación deseables. Estos resultados de separación deseables pueden mejorarse adicionalmente cuando se usan perlas de polímero hidrófobo esféricas, que se fabrican a partir de un material adecuado y con un tamaño de poro promedio en el intervalo de entre 13 - 25 nm. Las perlas de polímero porosas adecuadas de la presente invención presentan preferiblemente áreas de superficie (BET) en el intervalo de 300 a 1000 m^2/g (metros cuadrados por gramo), más preferiblemente en el intervalo de 450 a 850 m^2/g , y lo más preferiblemente en el intervalo de 500 a 800 m^2/g .

Los monómeros vinil-aromáticos monoinsaturados adecuados que pueden usarse en la preparación de las perlas de polímero porosas descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, estireno, estirenos sustituidos con alquilo C1 - C4, vinilnaftaleno y vinilantraceno. Preferiblemente, el monómero vinil-aromático monoinsaturado se selecciona de uno o más de estireno y estirenos sustituidos con alquilo C1 - C4. En el grupo de estirenos sustituidos con alquilo C1 - C4 adecuados se incluyen etilvinilbencenos, viniltoluenos, dietilestirenos, etilmetilestirenos y dimetilestirenos. Se entiende que cualquiera de los diversos isómeros de posición de cada uno de los monómeros vinil-aromáticos anteriormente mencionados es adecuado.

Esto significa que perlas de polímero porosas adecuadas en la presente invención pueden prepararse particularmente usando uno o más monómeros seleccionados del grupo que consiste en vinilbenceno (estireno), etilestireno, divinilbenceno, trivinilbenceno, diviniltolueno, divinilnaftaleno, divinilantraceno, divinilxileno y cualquier isómero estructural de estos monómeros.

Preferiblemente los polímeros porosos se preparan usando copolímeros de vinilbenceno (estireno) y divinilbenceno o etilestireno y divinilbenceno. En una realización preferida de la invención las perlas de polímero reticulado porosas aplicadas comprenden estireno y divinilbenceno en una razón en peso de uno con respecto a otro de desde el 98 : 2 hasta el 10 : 90%.

Opcionalmente también pueden usarse monómeros alifáticos insaturados, por ejemplo ácidos (met)acrílicos y ésteres alquílicos de ácidos (met)acrílicos, además del monómero vinil-aromático para la preparación de dichas perlas de polímero hidrófobo porosas descritas en el presente documento. Estos monómeros insaturados alifáticos pueden usarse como agentes de reticulación en la preparación de las perlas de polímero deseadas.

5 Se seleccionan monómeros de reticulación alifáticos adecuados del grupo que consiste en diacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de etilenglicol, triacrilato de trimetilolpropano, trimetacrilato de trimetilolpropano, divinil éter de dietilenglicol y trivinilciclohexano, y que pueden usarse para la preparación de perlas de polímero hidrófobo reticulado porosas según la presente invención. Los monómeros alifáticos pueden usarse solos o en combinación con monómeros polivinil-aromáticos mencionados anteriormente como monómeros de reticulación.

10 En ambas variantes, dimetacrilato de etilenglicol, metacrilato de glicidilo y divinil éter de dietilenglicol son especialmente adecuados para la preparación de perlas porosas. Preferiblemente estos monómeros de reticulación alifáticos se usan en combinación con monómeros de reticulación polivinil-aromáticos. En estas condiciones, los monómeros alifáticos están comprendidos normalmente en una cantidad que oscila entre el 0 y el 50% y preferiblemente en una cantidad que oscila entre el 0 y el 30%, basándose en el peso de monómero total usado para formar las perlas de polímero porosas y
15 rígidas.

En el uso de la invención de partículas de polímero porosas descritas en el presente documento se logran resultados de separación superiores usando perlas de polímero porosas que consisten en poliestireno, que está reticulado con un copolímero de divinilbenceno o un derivado del mismo y un monómero seleccionado del grupo que consiste en
20 dimetacrilato de etilenglicol y divinil éter de dietilenglicol y en las que la razón de poliestireno y copolímero de reticulación está en un intervalo de desde el 98 : 2 hasta el 10 : 90% en peso. En una realización preferida se usan partículas porosas que consisten en poli(etil)estireno, que están reticuladas con copolímero de divinilbenceno y metacrilato de etilenglicol en una razón de desde el 98 : 2 hasta el 14 : 86% en peso. Con respecto a esto, se ha encontrado que para la separación de proteínas de células huésped (HCP), fragmentos de anticuerpo y sustancias de bajo peso molecular a partir de disoluciones que contienen anticuerpos las perlas porosas son más adecuadas, en las
25 que están contenidos monómeros (di)vinil-aromáticos en una cantidad de más del 50% en peso. Por tanto, se prefieren perlas porosas que consisten en polímero de compuestos monovinil-aromáticos, que está reticulado con copolímero de divinilbenceno y metacrilato de etilenglicol en una razón de aproximadamente el 10 : 90 al 98 : 2% en peso. Se prefieren más perlas porosas de este tipo en las que la razón es de aproximadamente 14 : 86 en peso.

30 Los polímeros porosos hidrófobos preferidos se seleccionan de uno o más de copolímero de vinilbenceno (estireno), copolímero de etilvinilbenceno (etilestireno), copolímero de divinilbenceno, copolímero de poliestireno-divinilbenceno reticulado, poliestireno-dimetacrilato de etilenglicol reticulado, polidivinilbenceno-dimetacrilato de etilenglicol reticulado. Lo más preferido son copolímero de poli(etil)estireno-divinilbenceno reticulado y poli(etil)estireno reticulado con copolímero de divinilbenceno y dimetacrilato de etilenglicol.

35 Los formadores de poros útiles para preparar los polímeros porosos incluyen formadores de poros hidrófobos, tales como hidrocarburos aromáticos ($C_7 - C_{10}$) e hidrocarburos saturados ($C_6 - C_{12}$) y formadores de poros hidrófilos, tales como alcoholes ($C_4 - C_{10}$) y polialquilenglicoles. Por tanto, pueden seleccionarse formadores de poros adecuados, por ejemplo, del grupo que consiste en tolueno, etilbenceno, orto-xileno, meta-xileno, para-xileno. Se entiende que cualquiera de los diversos isómeros de posición de cualquiera de los hidrocarburos anteriormente mencionados es adecuado. Preferiblemente, el hidrocarburo aromático es tolueno o xileno o una mezcla de xilenos o una mezcla de
40 tolueno y xileno. Además, tal como se indicó anteriormente, también pueden usarse hidrocarburos saturados como formadores de poros. Los ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo hexano, heptanos o isooctano. El hidrocarburo saturado preferido en este caso de la presente invención es isooctano. Los alcoholes adecuados incluyen, pero no se limitan a, alcohol isobutílico, alcohol terc-amílico, alcohol n-amílico, alcohol isoamílico, metilisobutilcarbinol, (4-metil-2-pentanol), hexanoles y octanoles. Preferiblemente una mezcla de formadores de poros
45 comprende un formador de poros hidrófilo seleccionado de uno o más alcoholes ($C_5 - C_8$) y un formador de poros hidrófobo seleccionado de uno o más hidrocarburos aromáticos ($C_7 - C_{10}$).

Normalmente el formador de poros se añade a la suspensión de polimerización en exceso, habitualmente en una cantidad total del 100 al 170%, preferiblemente desde el 115 - 150 y más preferiblemente desde el 120 hasta el 140%, basándose en el peso de los monómeros. Además, los formadores de poros usados para preparar los polímeros según la
50 presente invención se mezclan con un sistema de disolventes, que comprende al menos un disolvente hidrófobo y opcionalmente un disolvente menos hidrófobo (disolvente "hidrófilo") y que soportan ambos la construcción de perlas porosas. Resulta evidente que el disolvente menos hidrófobo (o "hidrófilo" tal como se mencionó anteriormente) tiene al menos algo de solubilidad en agua limitada, por ejemplo, que oscila entre el 0,5 y el 5%, mientras que el disolvente hidrófobo muestra una solubilidad en agua de 10 a 100 ppm o menos.

55 Generalmente, la razón de formador de poros con baja hidrofobia (es decir, "formador de poros hidrófilo") con respecto al formador de poros hidrófobo está en el intervalo de desde 0,7 : 1 hasta 3 : 1, preferiblemente en el intervalo de desde 0,8 : 1 hasta 2,5 : 1, lo más preferiblemente desde 0,9 : 1 hasta 2,4 : 1.

Un experto habitual en la técnica conoce bien iniciadores de polimerización útiles en la preparación de polímeros adecuados en la presente invención e incluyen iniciadores solubles en monómeros tales como peróxidos,

hidroperóxidos e iniciadores relacionados. Estos iniciadores están comercialmente disponibles. También son útiles los iniciadores de azo tales como azodiisobutironitrilo, azodiisobutiramida y similares. Dependiendo de la naturaleza del iniciador, los niveles de uso están en intervalos del 0,5 al 10% basándose en el peso total de los monómeros de vinilo que comprende.

Además, dispersantes o agentes de suspensión útiles para preparar las perlas de polímero porosas pueden ser tensioactivos habituales, que son iónicos y pueden contener cadenas de alquilo hidrófobas que contienen de 1 a 24 átomos de carbono. Otro grupo comercialmente disponible de dispersantes que es adecuado en la polimerización en suspensión son tensioactivos no iónicos, que se basan en derivados de hidroxialquilcelulosa epoxidada. Normalmente estos aditivos se usan a niveles de desde aproximadamente el 0,01 hasta el 4% basándose en el peso total de la fase acuosa.

Si resulta adecuado, pueden usarse otros dispersantes y pueden aplicarse junto con esos tensioactivos y dispersantes. Por ejemplo, pueden usarse dispersantes poliméricos incluyendo celulosas, polivinilpirrolidonas, poli(alcoholes vinílicos), almidones y similares en mezclas con otros tensioactivos o dispersantes usados en el presente documento. Pero lo más preferido es la adición de tensioactivos iónicos, que pueden retirarse fácilmente a partir de las perlas de polímero preparadas aclarando con agua.

Para la preparación de las perlas de polímero hidrófobo porosas dadas a conocer en el presente documento, se prepara una disolución de fase acuosa continua que contiene adyuvantes de suspensión y después se mezcla esta disolución con una mezcla de monómeros que contiene el monómero polivinil-aromático, iniciador de radicales libres y, por ejemplo, de 1 a 1,7 partes de formador de poros (mixto) (formador de poros hidrófobo e hidrófilo) por una parte de mezcla de monómeros. Después se polimerizan las combinaciones de monómero/formador de poros a temperatura elevada (normalmente a de 40 a 100°C, por ejemplo durante de 1 a aproximadamente 15 horas) y posteriormente se retiran los formadores de poros a partir de las perlas de polímero resultantes, por ejemplo mediante destilación o lavado con disolvente. Después se aíslan las perlas de polímero porosas resultantes mediante medios convencionales, tales como eliminación de agua y secado.

Opcionalmente la preparación de las perlas de polímero puede incluir un tratamiento para limpiar la superficie de polímero de residuos de dispersantes y agentes de suspensión usados durante la polimerización. Este tratamiento puede incluir un tratamiento enzimático tal como se da a conocer en la bibliografía de patentes (documentos JP 61-141704 o JP 57-98504 o EP 1 179 732 B1).

Las perlas de polímero preparadas son especialmente adecuadas en columnas empaquetadas, debido a su porosidad y resistencia mecánica. Ventajosamente, estas perlas de polímero porosas y rígidas son útiles para la separación de proteínas de células huésped (HCP), fragmentos de anticuerpo y sustancias de bajo peso molecular a partir de disoluciones que contienen anticuerpos poniendo en contacto la disolución con estas perlas de polímero en columnas de cromatografía líquida incluso a presiones elevadas. Estas perlas son especialmente adecuadas para separaciones y purificaciones de alta resolución de biomoléculas a altas tasa de rendimiento sin acumulación de presión debido al uso prolongado.

Las perlas de polímero porosas tal como se usan en la presente invención se caracterizan por porosidades y distribuciones de tamaño de poro seleccionadas, que pueden determinarse mediante cromatografía de exclusión molecular inversa (ISEC). Las perlas de polímero adecuadas en la presente invención tienen normalmente una porosidad ε en el intervalo de 0,4 a 1,0 y preferiblemente en el intervalo de 0,45 a 0,75. Estas perlas presentan un área de superficie que oscila entre 300 y 100 m²/g [BET], más preferiblemente entre 450 y 850 m²/g, y lo más preferiblemente en el intervalo muy estrecho de 500 a 800 m²/g.

Las perlas de polímero tal como se da a conocer en este caso son inesperadamente bien adecuadas para la separación de proteínas de células huésped (HCP), fragmentos de anticuerpo y sustancias de bajo peso molecular a partir de disoluciones que contienen anticuerpos monoclonales. Debido a su naturaleza química y a su estructura nanoporosa, estos materiales son especialmente adecuados para la interacción hidrófoba con proteínas de bajo peso molecular y pueden incorporarse en procedimientos de purificación de proteínas basados en columna de cromatografía en un modo de flujo a través. Las propiedades de estas perlas de polímero porosas y el tipo de control de procedimiento dan como resultado una reducción de la carga de columnas de cromatografía, y por consiguiente se aumenta la vida útil de las columnas de cromatografía, al tiempo que se reducen los niveles de impurezas críticas, tales como HCP y fragmentos de anticuerpo. Ventajosamente, las perlas de poliestireno aplicadas no necesitan derivatizarse y, por tanto, son mucho más económicas que los geles de cromatografía habitualmente usados en esta etapa de purificación. Los materiales de separación descritos en el presente documento son bastante económicos y pueden regenerarse, reduciendo de ese modo los costes globales de la plataforma de purificación de anticuerpos y más allá.

Además, sorprendentemente, los materiales hidrófobos en el presente documento pueden usarse o bien aguas arriba o bien aguas abajo de una etapa de cromatografía de captura para reducir el nivel de una o más impurezas. En algunas realizaciones según los métodos reivindicados, se pone una muestra en contacto con un material hidrófobo antes de la etapa de cromatografía de afinidad a proteína A. En general, la etapa de cromatografía de afinidad a proteína A se usa antes de poner en contacto una muestra con un material hidrófobo.

Adicionalmente, la aplicación de material hidrófobo no se limita a los ejemplos dados, ya que se basa en mecanismos de exclusión molecular y adsorción hidrófoba de sustancias de bajo peso molecular, especialmente compuestos de masa molecular <70 kDa. Esto da como resultado una retirada selectiva de moléculas relacionadas con anticuerpos monoclonales, tales como fragmentos de anticuerpo o HCP.

Además, la presente invención proporciona una etapa de purificación de anticuerpos basada en cromatografía, en la que el material de cromatografía descrito en el presente documento puede regenerarse y es aplicable en un amplio intervalo de funcionamiento (por ejemplo pH 3-11; conductividad de 1 mS/cm – 50 mS/cm, velocidad de operativa 150 cm/min – 1000 cm/min). En particular, la resistencia de las perlas de polímero porosas a valores de pH bajos y altos supone una gran ventaja en este caso debido a que es posible una regeneración satisfactoria y estos materiales tienen una vida útil considerablemente más larga.

Tal como ya se indicó anteriormente, la retirada de sustancias de bajo peso molecular, especialmente compuestos de masa molecular <70 kDa, a partir de caldos de cultivo celular aclarado usando las perlas de polímero hidrófobo porosas descritas en el presente documento, puede realizarse tanto a escala industrial y como también a escala micrométrica, ya que los materiales de separación seleccionados son estables frente a la presión y no son propensos a la deformación a altas presiones. El usuario tiene libertad en cuanto a la manera de llevar a cabo la purificación cromatográfica. Resulta evidente que, dependiendo de la naturaleza del cultivo celular aplicado y de las proteínas de bajo peso molecular, una u otra composición de las partículas de polímero porosas puede ser ventajosa para la etapa de purificación. En este caso, el experto tiene la elección entre polímeros porosos fabricados a partir de compuestos (vinil) alquil-aromáticos puros o aquellos que están reticulados mediante acrilatos adecuados. En este caso, un experto habitual en la técnica puede identificar fácilmente las perlas de polímeros más adecuadas.

Pero estos materiales no están limitados a usarse para la retirada de sustancias de bajo peso molecular, especialmente compuestos de masa molecular <70 kDa tales como fragmentos de anticuerpo o HCP. Sorprendentemente, se encontró que la proteína A, que no se separa en etapas de purificación previas o que no se elimina mediante lavado, puede separarse fácilmente a partir de medios de cultivo celular usando las perlas de polímero hidrófobo porosas según la presente invención. Sorprendentemente, la separación de proteína A a partir de medios de cultivo celular puede realizarse independientemente del valor de pH del medio usando las perlas de polímero porosas. En experimentos, puede mostrarse que, por ejemplo, la resina PS-DVB-EGDMA puede adsorber proteína A en disoluciones a pH 4,00 y pH 8,00 en condiciones de unión estática.

En caso de tratamiento combinado con resina de intercambio iónico comercialmente disponible específica para la separación de proteína A y con perlas de polímero hidrófobo porosas y en el que se conectan dispositivos uno después de otro en una secuencia, por ejemplo, columnas empaquetadas con resinas de intercambio iónico, por ejemplo, empaquetadas con Eshmuno®CPX seguido por Eshmuno®Q seguido por PS-DVB-EGDMA, se alcanza fácilmente un agotamiento de hasta <10 ng de HCP, incluyendo la retirada de proteína A lixiviada.

La presente descripción permite a un experto habitual en la técnica poner en práctica la presente invención de manera exhaustiva. Por tanto, incluso sin comentarios adicionales, se supone que un experto habitual en la técnica podrá usar la descripción anterior en el alcance más amplio.

Si algo no queda claro, se entiende que deben consultarse las publicaciones y la bibliografía de patentes citadas.

Para una mejor comprensión, y con el fin de ilustrar la invención, a continuación se describen ejemplos que están dentro del alcance de protección de la presente invención. Estos ejemplos también sirven para ilustrar posibles variantes.

Además, no hace falta mencionar para un experto habitual en la técnica que, tanto en los ejemplos facilitados como también en el resto de la descripción, las cantidades de componentes presentes en las composiciones siempre suman únicamente el 100% en peso o % en moles, basándose en la composición en su conjunto, y no pueden superar este porcentaje, aunque puedan producirse valores superiores a partir de los intervalos en porcentaje indicados. Por tanto, a menos que se indique lo contrario, los datos en % son % en peso o % en moles, con la excepción de razones, que se muestran en datos en volumen.

Tal como se usan a lo largo de la memoria descriptiva, los siguientes términos tendrán los siguientes significados, a menos que el contexto indique claramente lo contrario:

El término “(met)acrilato de alquilo” se refiere al éster o bien de acrilato o bien de metacrilato correspondiente; de manera similar, el término “(met)acrílico” se refiere al ácido o bien acrílico o bien metacrílico y a los derivados correspondientes, tales como ésteres o amidas. Tal como se indicó anteriormente, todos los porcentajes a los que se hace referencia se expresarán en porcentaje en peso (%), basándose en el peso total de polímero o composición (disolución) implicado, a menos que se especifique lo contrario. El término “copolímero” se refiere a composiciones de polímero que contienen unidades de dos o más monómeros diferentes, incluyendo isómeros de posición.

En el presente documento se usan las siguientes abreviaturas:

g = gramos,

ppm = partes por millón en peso/volumen,

m = metro,

cm = centímetro,

mm = milímetro,

5 μm = micrómetro (micra) = 10^{-6} m,

nm = nanómetro = 10^{-9} m,

ml = mililitro,

L = Litro.

A menos que se especifique lo contrario, los intervalos indicados deben interpretarse como inclusivos y combinables.

10 Las temperaturas facilitadas en los ejemplos y la descripción así como en las reivindicaciones son siempre en grados centígrados ($^{\circ}\text{C}$).

Métodos:

Características de partículas:

15 La caracterización de partículas se conoce en la técnica y se describe por: I. C. Edmundson, Particle-size analysis, H. S. Bean, A. H. Beckett y J. E. Carles (eds) en: Advances in Pharmaceutical Sciences vol. 2, Academic Press, Londres 1967, 95-174.

La distribución de tamaño de partícula y el diámetro promedio pueden medirse mediante difracción láser usando un dispositivo Mastersizer 2000E (Malvern Instruments Ltd., R.U.) o mediante técnica de bloque de luz láser (Accusizer™, modelo 770, Particle Sizing Systems, Santa Barbara, Calif., EE.UU.).

20 La forma y características de superficie (porosidad) de las microesferas pueden establecerse mediante análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM).

25 El tamaño de poro se determina mediante métodos que se conocen en la técnica. Pueden determinarse macroporos usando porosimetría de mercurio. En este caso, experimentos para analizar los tamaños de poro se realizan siguiendo el protocolo del analizador de porosimetría de mercurio (por ejemplo, dispositivo AutoPore IV 9500, Micromeritics, EE.UU.). También es posible estimar las dimensiones de poro a partir de microfotografías electrónicas de barrido (SEM) en las que se observan el diámetro y las características de superficie de las microesferas de polímero después de secar mediante microscopio electrónico de barrido (SEM) (JSM-6700F, JEOL, Japón). Vuelven a suspenderse las microesferas en agua destilada y se añade gota a gota la dispersión sobre un fragmento de lámina de aluminio y se seca a atmósfera ambiental. Se coloca la muestra sobre un portamuestras de metal con cinta adhesiva conductora de doble cara y se recubre con una película de oro delgada a presión reducida por debajo de 5 Pa con un dispositivo de recubrimiento fino JFC-1600 (JEOL, Japón).

30 También pueden determinarse el tamaño de poro de mesoporos y su área de superficie específica usando mediciones de adsorción/desorción de nitrógeno (método de BET), que se realizan siguiendo protocolos convencionales. Este último método también puede usarse para determinar el área de superficie de BET.

35 Prueba ELISA de HCP

40 Las proteínas purificadas siempre contienen pequeñas cantidades de proteínas contaminantes a partir del organismo de expresión, denominadas proteínas de células huésped (HCP). Estas proteínas de células huésped (HCP) en productos biológicos son impurezas relacionadas con procedimiento que deben identificarse y evaluarse de manera cualitativa y cuantitativa. Para cuantificar la eficacia de purificación del método de separación en el presente documento se da a conocer un sistema de prueba ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) que se usa. Los sistemas de prueba ELISA son específicos de procedimiento para la detección de HCP a partir de una bacteria específica o a partir de líneas celulares cultivadas específicas (por ejemplo cultivos de células de ovario de hámster chino (CHO)).

45 El principio, por ejemplo, de un kit de ELISA de HCP de CHO se basa en la unión de proteínas de CHO en muestras a dos anticuerpos, uno inmovilizado en los micropocillos y el otro conjugado a peroxidasa de rábano (HRP). Después de la incubación y una etapa de lavado, se añade sustrato cromogénico (TMB) y se desarrolla color mediante la reacción enzimática de HRP en el sustrato, que es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Se añade una disolución de parada para terminar la reacción y después se mide la absorbancia a 450 nm usando un lector de micropocillos de ELISA. Se calcula la concentración de proteínas de CHO en muestras y control a partir de una curva estándar de HCP de CHO.

Otro método para la cuantificación de HCP separadas se realiza mediante SDS-PAGE, seguido por análisis de bandas mediante software de análisis de gel BioDoc.

El principio del análisis de SDS-PAGE consiste en SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e implica la separación de proteínas basándose en su tamaño. Calentando la muestra en condiciones desnaturalizantes y reductoras, las proteínas se despliegan y se recubren con moléculas de detergente de SDS, adquiriendo una alta carga negativa neta que es proporcional a la longitud de la cadena de polipéptido. Cuando se cargan en una matriz de gel y se colocan en un campo eléctrico, las moléculas de proteína cargadas negativamente migran hacia el electrodo cargado positivamente y se separan mediante un efecto de tamizado molecular. Después de la visualización mediante una técnica de tinción específica de proteínas, puede estimarse el tamaño de una proteína mediante comparación de su distancia de migración con la de un patrón de peso molecular conocido. También es posible transferir las proteínas separadas sobre una membrana cargada positivamente y analizar con sonda con anticuerpos específicos de proteína en un procedimiento denominado inmunotransferencia de tipo Western.

La documentación y el posterior análisis de las proteínas separadas pueden realizarse mediante el sistema BioDocAnalyze, una cámara digital de calidad científica y software incluido para el análisis de geles y transferencias. Este sistema está comercialmente disponible.

Lista de figuras:

Figura 1a: reducción de mAb03 y reducción de HCP (%) en diversas combinaciones de anticuerpos tras captura con proteína A después del tratamiento en diferentes condiciones.

Figura 1b: reducción de mAb05 y reducción de HCP (%) en diversas combinaciones de anticuerpos tras captura con proteína A después del tratamiento en diferentes condiciones

Figura 1c: reducción de mAb07 y reducción de HCP (%) en diversas combinaciones de anticuerpos tras captura con proteína A después del tratamiento en diferentes condiciones

Figura 1d: reducción de mAb08 y reducción de HCP (%) en diversas combinaciones de anticuerpos tras captura con proteína A después del tratamiento en diferentes condiciones

Figura 2a: reducción de mAb05 y reducción de HCP (%) después del tratamiento en diferentes condiciones con material particulado de PS-DVB poroso que tiene poros de 31,4 nm de diámetro promedio.

Figura 2b: reducción de mAb05 y reducción de HCP (%) después del tratamiento en diferentes condiciones con material particulado de PS-DVB que tiene poros de 20,4 nm de diámetro promedio.

Figura 2c: reducción de mAb05 y reducción de HCP (%) después del tratamiento en diferentes condiciones con material particulado de PS-DVB que tiene poros de 15,8 nm de diámetro promedio.

Figura 3: reducción de AcM y reducción de HCP (%) después del tratamiento con material particulado de PS-DVB que tiene poros de 15,8 nm de diámetro promedio.

Figura 4: reducción de AcM y reducción de HCP (%) después del tratamiento con material particulado de PS-DVB que tiene poros de 15,8 nm de diámetro promedio y clasificado para diferentes tamaños de partículas, que oscilan entre >63 µm (línea superior), y 40-63 µm (línea central) y 20-40 µm (línea inferior).

Figura 5: niveles de mAb03 y niveles de punto de inflexión de fragmentos que contienen FC a diferentes cargas para materiales particulados de PS-DVB (PS01) - tamaño de poro promedio 31,4 nm, para PS-DVB (PS02) - tamaño de poro promedio 20,4 nm y PS-DVB (PS03) - tamaño de poro promedio 15,8 nm.

Figura 6: niveles de mAb03 y niveles de punto de inflexión de HCP a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que los materiales 30422 (d_{50} -36,1 µm) y PS02 (d_{50} -40,9 µm) consisten en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno, el material 30410 (d_{50} -35,2 µm) consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%) y 30423 (d_{50} -35,5 µm) consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (50%) y dimetilacrilato de etilenglicol (50%).

Figura 7a: niveles de punto de inflexión de HCP de mAb06 a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que los materiales 30422 (d_{50} -36,1 µm) y PS02 (d_{50} -40,9 µm) consisten en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno, el material 30410 (d_{50} -35,2 µm) consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%). Serie 3 y serie 5 realizadas con combinación tras proteína A de mAb06 (pH 5,0, conductividad - 1,4 mS/cm) y la serie 4, la serie 7 y la serie 9 se realizaron con combinación tras proteína A de mAb06, en la que se añadió NaCl para aumentar la conductividad de la combinación hasta 3 mS/cm.

Figura 7b: niveles de punto de inflexión de LMW de mAb06 (%) a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que los materiales 30422 (d_{50} -36,1 µm) y PS02 (d_{50} -40,9 µm) consisten en poli(etil)estireno (m),

- reticulado con copolímeros de divinilbenceno, el material 30410 (d_{50} -35,2 μ m) consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%). Serie 3 y serie 5 realizadas con combinación tras proteína A de mAb06 (pH 5,0, conductividad - 1,4 mS/cm) y la serie 4, la serie 7 y la serie 9 se realizaron con combinación tras proteína A de mAb06, en la que se añadió NaCl para aumentar la conductividad de la combinación hasta 3 mS/cm.
- Figura 7c: niveles de punto de inflexión de LMW de mAb05 (%) a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que el material PS02 (d_{50} -40,9 μ m) consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno, el material MS39 (d_{50} -35,2 μ m) consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%) y AC es carbono activado natural (Nuchar HD).
- Figura 7d: niveles de punto de inflexión de HCP de mAb05 a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que el material PS02 (d_{50} -40,9 μ m) consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno, el material MS39 (d_{50} -35,2 μ m) consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%) y AC es carbono activado natural (Nuchar HD).
- Figura 8: niveles de punto de inflexión de HCP de mAb03 a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que el material 30410 consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%). Las series 1-3 representan series secuenciales después de la limpieza y reequilibrado de la columna.
- Figura 9: niveles de punto de inflexión de HCP de mAb03 a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que el material 30410 consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%). P242 es material hidrófobo de competencia, P248 es material hidrófobo de competencia y Nuchar HD es material de carbono activado, que está dimensionado a 40-63 μ m.
- Figura 10a: niveles de HCP en diversas combinaciones de mAb03 tras proteína A (por ejemplo Prosep Ultra Plus (PUP), Mab Select Sure, Eshmuno A) después de diferentes cargas en material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que este material consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%).
- Figura 10b: niveles de HCP en diversas combinaciones de mAb07 de proteína A (por ejemplo PUP, MAB Select Sure Eshmuno A) después de diferentes cargas en material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que este material consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%).
- Figura 11: niveles de punto de inflexión de HCP de mAb03 a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que en un experimento se añadió NaCl hasta una concentración de 0,5 M. El material 30451 consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno, el material 30410 consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%).
- Figura 12: niveles de punto de inflexión de HCP de mAb03 que se hacen funcionar a 900 cm/h para diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que el material 30410 consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%). P242 es material hidrófobo de competencia, P248 también es material hidrófobo de competencia.
- Figura 13: análisis de SDS-PAGE reducido de adsorción de proteína A en resinas de DVB-EGDMA, Eshmuno® S y Eshmuno® Q.

Ejemplos

Perlas de base:

Síntesis de material a base de poliestireno (tal como P353, P374 y P375)

Se disuelven 25,6 g de poli(alcohol vinílico) y 0,38 g de SDS en 614,2 g de agua para formar la fase acuosa para la siguiente polimerización en suspensión. Se forma la fase orgánica mediante una disolución homogénea de 19,94 g de etilvinilbenceno, 75 g de divinilbenceno, 41,57 g de dimetilacrilato de etilenglicol, 90,24 g de tolueno, 90,24 g de 2-etil-1-hexanol y 0,96 g de AIBN. Se añade la fase orgánica a la fase acuosa en un recipiente de reactor y se emulsionan las dos fases a 25°C con un agitador a 480 rpm para lograr la distribución de tamaño de partícula prevista. Después de 60 min se añaden 640 g de agua y se calienta la mezcla de reacción hasta 72°C. Durante dos horas se mantiene la temperatura a 72°C y después se aumenta hasta 82°C. Se polimeriza la mezcla a 82°C durante dos horas adicionales. Después de la polimerización, se filtra la suspensión en un embudo de filtro y se lavan las partículas con 1,5 litros de agua a 60°C, seguido por 5 litros de metanol a 60°C, 5 litros de tolueno y 2 litros de metanol a 40°C. Se seca el producto final en un horno de vacío durante 24 horas a 50°C y 50 mbar. El rendimiento con respecto a la masa seca es cuantitativo. Dependiendo de la distribución de tamaño de partícula prevista, se clasifica el producto final mediante tamizado según procedimientos que son estado de la técnica.

Ejemplo 1

En este experimento, se evalúan diferentes materiales para determinar su capacidad para retirar impurezas a partir de combinaciones tras captura con proteína A. Se someten a prueba dos materiales hidrófobos:

a) material particulado que consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (PS-DVB) y

5 b) material particulado que consiste en poliestireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno y copolímeros de dimetilacrilato de etilenglicol (PS-DVB-EGDMA), para determinar la retirada de impurezas en modo estático. Se usa solución salina tamponada con fosfato (PBS, fosfato 10 mM, pH 7,4) como tampón de equilibrio y lavado para los materiales sometidos a prueba antes de someterlos a combinaciones tras captura con proteína A. Se someten muestras a dos combinaciones tras captura con proteína A diferentes durante la noche con agitación vigorosa y bajo un conjunto de cargas correspondientes a una carga de anticuerpo (razón en peso) por volumen de material particulado. Esas cargas son 0,5, 1 y 2 kg/l. Después de la incubación durante la noche se separa el material particulado por filtración y se analizan las muestras usando métodos de cromatografía de exclusión molecular, ELISA de HCP y HPLC de prot. A para recopilar los datos de rendimiento. El resultado de este experimento muestra que ambos materiales particulados usados en este experimento adsorben HCP y fragmentos de anticuerpo (véanse las tablas 1, 2).

15 Tabla 1: Retirada de fragmentos estática para múltiples anticuerpos

Anticuerpo	Material	Cantidad de partida de fragmento (%)	Carga de 2 kg/l	Carga de 1 kg/l	Carga de 0,5 kg/l
mAb04	PS-DVB	1,97	1,41	0,88	0,00
mAb04	PS-DVB-EGDMA	1,99	1,62	1,18	0,72
mAb05	PS-DVB	0,31	0,12	0,03	0,00
mAb05	PS-DVB-EGDMA	0,31	0,15	0,10	0,00

Tabla 2: Retirada de proteínas de células huésped estática a partir de múltiples anticuerpos

Anticuerpo	Material	Carga de 2 kg/l (retirada de LRV)	Carga de 1 kg/l (retirada de LRV)	Carga de 0,5 kg/l (retirada de LRV)
mAb04	PS-DVB	0,61	0,96	1,24
mAb04	PS-DVB-EGDMA	0,45	0,91	1,29
mAb05	PS-DVB	1,71	2,15	2,21
mAb05	PS-DVB-EGDMA	1,63	1,89	2,26

Los rendimientos de anticuerpo todos estos experimentos fueron superiores al 80%.

Ejemplo 2

20 En este experimento, se evalúan diferentes materiales para determinar su capacidad para retirar fragmentos de anticuerpo añadidos a partir de combinaciones tras captura con proteína A.

Se examinan materiales hidrófobos:

a) material particulado que consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (PS-DVB) y

b) material particulado que consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno y copolímeros de dimetilacrilato de etilenglicol (PS-DVB-EGDMA),

25 para determinar su capacidad para retirar impurezas en modo estático.

30 Se usa solución salina tamponada con fosfato (PBS, fosfato 10 mM, pH 7,4) como tampón de equilibrio y lavado para los materiales sometidos a prueba antes de someterlos a combinaciones tras captura con proteína A de modelo, que se enriquecen con disolución de anticuerpo digerido con papaína. Se someten muestras a combinaciones tras captura con proteína A generadas durante la noche con agitación vigorosa y bajo un conjunto de cargas correspondientes a una carga de anticuerpo (razón en peso) por volumen de material particulado. Las cargas son 0,5 y 1 kg/l. Después de la incubación durante la noche, se separa el material particulado por filtración y se analizan las muestras usando métodos de cromatografía de exclusión molecular y HPLC de prot. A para recopilar los datos de rendimiento. Se observa que ambos materiales particulados usados adsorben fragmentos de anticuerpo añadidos (véase la tabla 3 a continuación).

Tabla 3: Retirada de fragmentos estática de fragmentos de anticuerpo añadidos

Anticuerpo	Material	Carga de 1 kg/l (retirada de LRV)	Carga de 0,5 kg/l (retirada de LRV)
mAb08	PS-DVB	0,22	0,48
mAb08	PS-DVB-EGDMA	0,9	0,21

En todos los experimentos, los rendimientos de anticuerpo son superiores al 80%.

Ejemplo 3

En este experimento, se evalúa material particulado, que consiste en poli(etil)estireno (m) reticulado con copolímeros de divinilbenceno (PS-DVB), para determinar su capacidad para retirar HCP a partir de diversas combinaciones de anticuerpos tras captura con proteína A, en el que se ajustan combinaciones tras proteína A a un amplio intervalo de condiciones de pH y conductividad. Se realizan mediciones por duplicado, mezclando 25 µl de material particulado y 1000 µl de PPP (fosfopéptidos de fosvitina; diluidos 1 : 4 en tampones de pH y conc. de NaCl diferentes) y se incuban durante 30 minutos. Se cuantifica la reducción de HCP mediante ensayos ELISA, mientras que la reducción de AcM se cuantifica mediante SDS-PAGE y se realiza un análisis de bandas posterior mediante software de análisis de gel BioDoc (véase la figura 1a-d).

Figura 1a: reducción de mAb03 y reducción de HCP (%) después del tratamiento en diferentes condiciones

Figura 1b: reducción de mAb05 y reducción de HCP (%) después del tratamiento en diferentes condiciones

Figura 1c: reducción de mAb07 y reducción de HCP (%) después del tratamiento en diferentes condiciones

Figura 1d: reducción de mAb08 y reducción de HCP (%) después del tratamiento en diferentes condiciones

Ejemplo 4

En este experimento, se evalúan materiales particulados que consisten en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (PS-DVB) que tienen diferentes tamaños de poro promedio (estimados mediante SEC inversa y software de PSS) para determinar su capacidad para retirar HCP a partir de combinación de cultivo celular aclarado, que se ha sometido a un amplio intervalo de condiciones de pH y conductividad. Se realizan mediciones por duplicado, mezclando 25 µl de material particulado y 1000 µl de PPP (diluido 1 : 4 en tampones de pH y conc. de NaCl diferentes) y se incuban durante 30 minutos. Se cuantifica la reducción de HCP mediante ensayos ELISA, mientras que la reducción de AcM se cuantifica mediante SDS-PAGE y se realiza un análisis de bandas posterior mediante software de análisis de gel BioDoc (véase la figura 2a-c):

Figura 2a: reducción de mAb05 y reducción de HCP (%) después del tratamiento en diferentes condiciones con material particulado de PS-DVB que tiene un tamaño de poro promedio de 31,4 nm de diámetro.

Figura 2b: reducción de mAb05 y reducción de HCP (%) después del tratamiento en diferentes condiciones con material particulado de PS-DVB que tiene un tamaño de poro promedio de 20,4 nm de diámetro.

Figura 2c: reducción de mAb05 y reducción de HCP (%) después del tratamiento en diferentes condiciones con material particulado de PS-DVB que tiene un tamaño de poro promedio de 15,8 nm de diámetro

Ejemplo 5

En este experimento, se evalúa material particulado que consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (PS-DVB) que tienen un tamaño de poro promedio de 15,8 nm (estimado mediante SEC inversa y software de PSS) para determinar su capacidad para retirar HCP a partir de combinación de cultivo celular aclarado. Se realizan mediciones por duplicado, mezclando 25 µl de material particulado y 1000 µl de PPP (diluido 1 : 4 en TRIS 50 mM, pH 9, NaCl 0,5 M) y se incuban durante 30 minutos. Se cuantifica la reducción de HCP mediante ensayos ELISA, mientras que la reducción de AcM se cuantifica mediante SDS-PAGE y se realiza un análisis de bandas posterior mediante software de análisis de gel BioDoc (véase la figura 3):

Figura 3: reducción de AcM y reducción de HCP (%) después del tratamiento con material particulado de PS-DVB que tiene tamaños de poro promedio de 15,8 nm de diámetro.

Ejemplo 6

En este experimento, se evalúa material particulado que consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (PS-DVB), que tienen un tamaño de poro promedio de 15,8 nm (estimado mediante SEC inversa y software de PSS) y clasificados (tamizado en húmedo) para diferentes intervalos de tamaño de material particulado, para determinar su capacidad para retirar HCP a partir de combinaciones tras captura con proteína A. Se realizan mediciones por duplicado, mezclando 25 µl de material particulado y 1000 µl de PPP (diluido 1 : 4 en TRIS 50 mM, pH 9, NaCl 0,5 M) y se incuban durante 30 minutos. Se cuantifica la reducción de HCP mediante ensayos ELISA, mientras que la reducción de AcM se cuantifica mediante SDS-PAGE y se realiza un análisis de bandas posterior mediante software de análisis de gel BioDoc (véase la figura 4):

Figura 4: reducción de AcM y reducción de HCP (%) después del tratamiento con material particulado de PS-DVB que tiene poros de 15,8 nm de diámetro promedio y clasificado para diferentes tamaños de partículas, que oscilan entre >63 µm (línea superior), y 40-63 µm (línea central) y 20-40 µm (línea inferior).

Ejemplo 7

En este experimento, se evalúan materiales particulados que consisten en poli(etil)estireno (m) reticulado con copolímeros de divinilbenceno (PS-DVB) que tienen diferentes tamaños de poro promedio (estimados mediante SEC inversa y software de PSS) para determinar su capacidad para retirar fragmentos de anticuerpo que contienen cadena pesada (FC) introducidos después de digestión con papaína y purificación por afinidad a prot. A a partir de una combinación de anticuerpos tras proteína A, en el que la cantidad conocida de fragmentos de anticuerpo que contienen FC digeridos y purificados se añade en la combinación de anticuerpos tras proteína A. Se realizan mediciones en modo dinámico, de empaquetar el material particulado en la columna cromatográfica y cargarlo con alimentación preparada a 300 cm/h después del equilibrado usando tampón de acetato 50 mM a pH 5,0. Se cuantifican los niveles de fragmentos mediante SEC-HPLC (véase la figura 5):

Figura 5: niveles de mAb03 y niveles de punto de inflexión de fragmentos que contienen FC a diferentes cargas para materiales particulados de PS-DVB (PS01) - tamaño de poro promedio 31,4 nm, para PS-DVB (PS02) - tamaño de poro promedio 20,4 nm y PS-DVB (PS03) - tamaño de poro promedio 15,8 nm.

Ejemplo 8

En este experimento, se evalúan materiales particulados que consisten en poli(etil)estireno (m) reticulado con divinilbenceno (PS-DVB) y copolímeros de dimetilacrilato de etilenglicol (PS-DVB-EGDMA) en diversas razones para determinar su capacidad para retirar HCP a partir de una combinación de anticuerpos tras proteína A. Se realizan mediciones en modo dinámico, de empaquetar el material particulado en la columna cromatográfica y cargarlo con alimentación de mAb03 tras proteína A (pH 5,0, LF ~3 mS/cm) a 350 cm/h después del equilibrado con tampón de acetato 50 mM pH 5,0, LF ~2 mS/cm durante >20 CV. El comienzo de la concentración de HCP es de 900 ng/ml y la concentración de AcM es de 8,4 mg/ml. Todos los materiales dimensionados a un tamaño de partícula de 20-40 µm y distribución de tamaño de partícula promedio estimada con un dispositivo Accusizer. Se cuantificaron los niveles de anticuerpo mediante SEC-HPLC y la cantidad de HCP mediante mediciones de ELISA (véase la figura 6):

Figura 6: niveles de mAb03 y niveles de punto de inflexión de HCP a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que los materiales 30422 (d₅₀-36,1 µm) y PS02 (d₅₀-40,9 µm) consisten en poli(etil)estireno (m) reticulado con copolímeros de divinilbenceno, el material 30410 (d₅₀-35,2 µm) consiste en poli(etil)estireno (m) reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%) y 30423 (d₅₀-35,5 µm) consiste en poli(etil)estireno (m) reticulado con copolímeros de divinilbenceno (50%) y dimetilacrilato de etilenglicol (50%).

Ejemplo 9

En este experimento, se evalúan materiales particulados que consisten en poli(etil)estireno (m) reticulado con divinilbenceno (PS-DVB) y copolímeros de dimetilacrilato de etilenglicol (PS-DVB-EGDMA) en diversas razones para determinar su capacidad para retirar HCP y sustancias de bajo peso molecular (por ejemplo fragmentos de anticuerpo) a partir de diversas combinaciones de anticuerpos tras proteína A. Se realizan mediciones en modo dinámico, de empaquetar el material particulado en la columna cromatográfica y cargarlo con alimentación de anticuerpos tras proteína A (pH 5,0) a 300 cm/h después del equilibrado con tampón de acetato 50 mM pH 5,0, LF ~2 mS/cm durante >20 CV. Todos los materiales dimensionados a un tamaño de partícula de 20-40 µm y distribución de tamaño de partícula promedio estimada con un dispositivo Accusizer. Se cuantifican los niveles de anticuerpos mediante SEC-HPLC y la cantidad de HCP mediante mediciones de ELISA (véase la figura 7a-d):

Figura 7a: niveles de punto de inflexión de HCP de mAb06 a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, los materiales 30422 (d₅₀-36,1 µm) y PS02 (d₅₀-40,9 µm) consisten en poli(etil)estireno (m) reticulado con copolímeros de divinilbenceno, el material 30410 (d₅₀-35,2 µm) consiste en poli(etil)estireno (m) reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%). La serie 3 y la serie 5 se realizan con combinación tras proteína A de mAb06 (pH 5,0, conductividad - 1,4 mS/cm) y la serie 4, la serie 7 y la serie 9 se realizan con combinación tras proteína A de mAb06, en la que se añade NaCl para aumentar la conductividad de la combinación hasta 3 mS/cm.

Figura 7b: niveles de punto de inflexión de LMW de mAb06 (%) a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que los materiales 30422 (d₅₀-36,1 µm) y PS02 (d₅₀-40,9 µm) consisten en poli(etil)estireno (m) reticulado con copolímeros de divinilbenceno, el material 30410 (d₅₀-35,2 µm) consiste en poli(etil)estireno (m) reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%). Serie 3 y serie 5 realizadas con combinación tras proteína A de mAb06 (pH 5,0, conductividad - 1,4 mS/cm) y la serie 4, la serie 7 y la serie 9 se realizan con combinación tras proteína A de mAb06, en la que se añade NaCl para aumentar la conductividad de la combinación hasta 3 mS/cm.

Figura 7c: niveles de punto de inflexión de LMW de mAb05 (%) a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que el material PS02 (d₅₀-40,9 µm) consiste en poli(etil)estireno (m) reticulado con copolímeros de divinilbenceno, el material MS39 (d₅₀-35,2 µm) consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%) y AC es carbono activado natural (Nuchar HD).

Figura 7d: niveles de punto de inflexión de HCP de mAb05 a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que el material PS02 (d_{50} -40,9 μm) consiste en poli(etil)estireno (m) reticulado con copolímeros de divinilbenceno, el material MS39 (d_{50} -35,2 μm) consiste en poli(etil)estireno (m) reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%) y AC es carbono activado natural (Nuchar HD).

5 Ejemplo 10

En este experimento, se evalúan materiales particulados que consisten en poli(etil)estireno (m) reticulado con copolímeros de divinilbenceno (PS-DVB) (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (PS-DVB-EGDMA) (30%) para determinar su capacidad para retirar HCP a partir de diversas combinaciones de anticuerpos tras proteína A y reutilizar el material particulado después de la limpieza. Se realizan mediciones en modo dinámico, de empaquetar el material particulado en la columna cromatográfica y cargarlo con alimentación de anticuerpos tras proteína A (pH 5,0) a 300 cm/h después del equilibrado con tampón de acetato 50 mM pH 5,0, LF ~2 mS/cm durante >20 CV. Los materiales dimensionados a un tamaño de partícula de 40-63 μm y distribución de tamaño de partícula promedio estimada con un dispositivo Accusizer. Después del uso, se eluye la columna con disolución de DPG al 60% durante 20 CV y se reequilibra con tampón de acetato 50 mM pH 5,0, LF ~2 mS/cm durante >20 CV. Se cuantifican los niveles de anticuerpos mediante SEC-HPLC y la cantidad de HCP mediante mediciones de ELISA (véase la figura 8):

Figura 8: niveles de punto de inflexión de HCP de mAb03 a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que el material 30410 consiste en poli(etil)estireno (m) reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%). Las series 1-3 representan series secuenciales después de la limpieza y reequilibrado de columna.

20 Ejemplo 11

En este experimento, se evalúa material particulado que consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (PS-DVB) (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (PS-DVB-EGDMA) (30%) en comparación con material hidrófobo comercialmente disponible para determinar su capacidad para retirar HCP a partir de diversas combinaciones de anticuerpos tras proteína A. Se realizan mediciones en modo dinámico, de empaquetar el material particulado en la columna cromatográfica y cargarlo con alimentación de anticuerpos tras proteína A (pH 5,0) a 600 cm/h después del equilibrado con tampón de acetato 50 mM pH 5,0, LF ~2 mS/cm durante >20 CV. Se cuantifican los niveles de anticuerpos mediante SEC-HPLC y la cantidad de HCP mediante mediciones de ELISA (véase la figura 9):

Figura 9: niveles de punto de inflexión de HCP de mAb03 a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que el material 30410 consiste en poli(etil)estireno (m) reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%). P242 es material hidrófobo de competencia, P248 es material hidrófobo de competencia y Nuchar HD es material de carbono activado, que se dimensionó a 40-63 μm .

Ejemplo 12:

La aplicación de diferentes tipos de carbono activado o resinas hidrófobas para la retirada de fragmentos de anticuerpo monoclonal a partir de una disolución de un anticuerpo monoclonal en condiciones estáticas.

Este ejemplo representativo demuestra que pueden retirarse selectivamente fragmentos de anticuerpo monoclonal a partir de una disolución de un anticuerpo monoclonal mediante tratamiento estático con diferentes tipos de carbono activado y diferentes tipos de resinas hidrófobas.

Se preparan disoluciones de MAB08 con aproximadamente el 1,7% de fragmentos de anticuerpo monoclonal y después se tratan con uno de tres tipos diferentes de carbono activado o dos tipos diferentes de resina hidrófoba en condiciones estáticas, tal como se describe a continuación.

Se preparan disoluciones madre de MAB08 mediante tratamiento del anticuerpo monoclonal purificado con enzima papaína para digerirlos en fragmentos. Tras la digestión, se inactiva la enzima añadiendo una disolución de yodoacetato 0,3 M. Se someten las disoluciones de anticuerpo monoclonal digerido a diálisis en agua con tubos de diálisis (kits de ensayo de diálisis RC convencional, Spectra/Por 1-3, MWCO de 3,5 K, anchura plana de 54 mm, número de serie: 132725, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, 90220 EE.UU.) para retirar sales de tampón. Los tubos de diálisis contienen aproximadamente 0,15 l de las disoluciones de anticuerpo monoclonal digerido que se sumergen en 4,0 l de agua durante 24 horas. Después se mueven los tubos de diálisis a un nuevo recipiente que contiene 4,0 l de agua fresca en el que permanecen sumergidos durante 24 horas adicionales.

Se prepara una disolución de MAB08 con adiciones conocidas de fragmentos de anticuerpo monoclonal a partir de 18,0 ml de MAB II digerido, 72,0 ml de MAB08 sin digerir en agua, y 9,0 ml de TRIS 250 mM a pH 7. Después se filtra la disolución a través de una membrana de 0,22 μm (Stericup®-GP con una membrana Millipore Express® PLUS de 0,22 μm , 250 ml, número de catálogo: SCGPU02RE, EMD Millipore Corp. Billerica, MA, 01821, EE.UU.).

Después se cargan tubos de centrifuga de 15 ml con 5 mg o 10 mg de carbono activado MeadWestVaco Nuchar HD (MeadWestVaco Corporation, Richmond, VA, EE.UU.), 10 mg de carbono activado Norit Darco KB-G (Norit Americas Inc., Marshall, Texas, EE.UU.) o 10 mg de carbono activado Norit CGP Super (Norit Americas Inc., Marshall, Texas,

EE.UU.). Se carga un segundo conjunto de tubos de centrifuga de 15 ml con 25 μ l o 50 μ l de o bien resina hidrófoba DVB o bien resina hidrófoba DVB-EGDMA. No se añade ningún medio a un tercer conjunto de tubos de centrifuga de 15 ml que se usan como control. Después, se añaden 5,0 ml de la disolución de MAB08 con adiciones conocidas de fragmentos que contiene el 1,7% de fragmentos a los tubos de centrifuga. Se deja que roten los tubos durante 20 horas. Después, se someten todos los tubos a centrifugación y se filtran a través de una membrana de 0,22 micrómetros (unidades de filtro de jeringa Millex®, Millex®-GV, 0,22 μ m, PVDF, 33 mm, esterilizadas por radiación gamma, número de catálogo: SLGV033RB, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, 01821, EE.UU.) para retirar cualquier partícula que pueda quedar suspendida en disolución. La cantidad del MAB08 restante en las muestras se determina mediante cuantificación de IgG mediante HPLC de proteína A. El porcentaje de fragmentos restantes en las muestras se determina mediante cromatografía de exclusión molecular.

Tal como se resume en la tabla 4 a continuación, este experimento demuestra que es posible retirar selectivamente fragmentos de anticuerpo monoclonal a partir de una disolución que contiene el anticuerpo monoclonal mediante tratamiento estático con diferentes tipos de carbono activado y diferentes tipos de resina hidrófoba. A medida que se aumenta la cantidad de carbono activado o resina hidrófoba añadida a la disolución de anticuerpo monoclonal, se reduce el porcentaje de fragmentos. Los datos indican el resultado inesperado de que pueden usarse ambas resinas para retirar selectivamente fragmentos de anticuerpo monoclonal a partir de una disolución de un anticuerpo monoclonal en condiciones de unión estática.

Tabla 4: Recuperación de anticuerpo monoclonal y porcentaje de fragmentos después del tratamiento estático de disoluciones de MAB08 con tres tipos diferentes de carbono activado y dos tipos diferentes de resinas hidrófobas.

Medios	Cantidad de medios	Concentración de MAB08	Recuperación de MAB08	Porcentaje de fragmentos
Promedio de dos controles	-	7,86	-	1,72
Nuchar HD	10 mg	7,75	99%	0,73
Nuchar HD	20 mg	7,60	97%	0,34
CGP Super	10 mg	7,53	96%	1,08
CGP Super	20 mg	7,57	96%	0,66
Darco KB-G	10 mg	7,73	98%	1,01
Darco KB-G	20 mg	7,76	99%	0,47
Resina de DVB-EGDMA	25 μ l	7,36	94%	1,41
Resina de DVB-EGDMA	50 μ l	7,60	97%	1,11
Resina de DVB	25 μ l	7,66	98%	1,07
Resina de DVB	50 μ l	7,52	96%	0,62

Ejemplo 13:

La aplicación de resinas hidrófobas para la retirada de fragmentos de anticuerpo monoclonal y HCP a partir de una disolución de un anticuerpo monoclonal en condiciones estáticas.

Este ejemplo representativo demuestra que pueden retirarse selectivamente tanto fragmentos de anticuerpo monoclonal como HCP a partir de una disolución de un anticuerpo monoclonal mediante tratamiento estático con diferentes tipos de resinas hidrófobas.

Se preparan disoluciones de MAB04 con aproximadamente el 1,99% de fragmentos de anticuerpo monoclonal y 21 ppm de HCP. Después se trata esta disolución con una de dos resinas hidrófobas diferentes en condiciones estáticas, tal como se describe a continuación.

Se produce MAB04 mediante un cultivo de células CHO, y se somete a un procedimiento de captura de cromatografía de proteína A eluyendo el producto con acetato 50 mM a pH 3,5. Se ajusta el pH de la disolución pH 7,5 usando base Tris 1,8 M y después se filtra a través de una membrana de 0,22 μ m (Stericup®-GP con una membrana Millipore Express® PLUS de 0,22 μ m, 250 ml, número de catálogo: SCGPU02RE, EMD Millipore Corp. Billerica, MA, 01821, EE.UU.). Mediante cromatografía de exclusión molecular se determina que la disolución resultante tiene el 1,99% de fragmentos que se determina mediante un ensayo de HCP de ELISA que tienen 21 ppm de HCP.

Después, se cargan tubos de centrifuga de 15 ml con 12,5 μ l, 25 μ l o 50 μ l de o bien resina de divinilbenceno (DVB) reticulado o bien resina de divinilbenceno-dimetacrilato de etilenglicol (DVB-EGDMA) reticulado. No se añade ningún medio a un segundo conjunto de tubos de centrifuga de 15 ml que se usa como control. Después, se añaden 5,0 ml de la disolución de MAB04 que contiene el 1,99% de fragmentos a los tubos de centrifuga. Se deja que los tubos roten durante 24 horas. Después se filtran todas las disoluciones a través de una membrana de 0,22 micrómetros (unidades de filtro de jeringa Millex®, Millex®-GV, 0,22 μ m, PVDF, 33 mm, esterilizadas por radiación gamma, número de catálogo: SLGV033RB, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, 01821, EE.UU.) para retirar cualquier partícula de

resina que pueda quedar suspendida en disolución. La concentración del MAB04 restante en las muestras se determina mediante espectrofotómetro de UV a 280 nm. El porcentaje de fragmentos restantes en las muestras se determina mediante cromatografía de exclusión molecular. La concentración de HCP restante en las muestras se determina mediante un ensayo ELISA.

- 5 Tal como se resume en las tablas 5a y 5b a continuación, se muestra la recuperación de anticuerpo monoclonal y el porcentaje de fragmentos en las disoluciones antes del tratamiento con las resinas hidrófobas. El experimento demuestra que el tratamiento estático de una disolución de anticuerpo monoclonal con resinas hidrófobas retira selectivamente fragmentos de anticuerpo monoclonal. A medida que se aumenta la cantidad de resina hidrófoba añadida a la disolución de anticuerpo monoclonal, se reduce el porcentaje de fragmentos restantes en la disolución. Los
10 datos indican el resultado inesperado de que pueden usarse resinas hidrófobas para retirar selectivamente fragmentos de anticuerpo monoclonal a partir de una disolución de un anticuerpo monoclonal en condiciones de unión estática.

Tabla 5a: Recuperación de anticuerpo monoclonal y porcentaje de fragmentos después del tratamiento estático de disolución de MAB04 con una resina hidrófoba de DVB-EGDMA.

Resina añadida (μl)	Recuperación de anticuerpo	HCP (ppm)	Porcentaje de fragmentos
0	-	21	1,99%
12,5	94%	7	1,62%
25,0	94%	3	1,18%
50,0	83%	1	0,72%

- 15 Tabla 5b: Recuperación de anticuerpo monoclonal y porcentaje de fragmentos después del tratamiento estático de MAB04 disolución con una resina hidrófoba de DVB reticulado.

Resina añadida (μl)	Recuperación de anticuerpo	HCP (ppm)	Porcentaje de fragmentos
0	-	21	1,99%
12,5	>99%	4	1,41%
25,0	97%	2	0,88%
50,0	96%	1	0,00%

Ejemplo 14:

La aplicación de resinas hidrófobas para la retirada de fragmentos de anticuerpo monoclonal y HCP a partir de una disolución de un anticuerpo monoclonal en condiciones estáticas.

- 20 Este ejemplo representativo demuestra que pueden retirarse selectivamente fragmentos de anticuerpo monoclonal a partir de una disolución de un anticuerpo monoclonal mediante tratamiento estático con diferentes tipos de resinas hidrófobas.

Se preparan disoluciones de MAB05 con aproximadamente el 0,31% de fragmentos de anticuerpo monoclonal y 578 ppm de HCP. Después se trata esta disolución con una de dos resinas hidrófobas diferentes en condiciones estáticas, tal como se describe a continuación.

- 25 Se produce MAB05 mediante un cultivo de células CHO y se somete a un procedimiento de captura de cromatografía de proteína A eluyendo el producto con acetato 50 mM a pH 3,5. Se ajusta el pH de la disolución pH 7,5 usando base Tris 1,8 M y después se filtra a través de una membrana de 0,22 μm (Stericup®-GP con una membrana Millipore Express® PLUS de 0,22 μm, 250 ml, número de catálogo: SCGPU02RE, EMD Millipore Corp. Billerica, MA, 01821, EE.UU.). Se
30 determina mediante cromatografía de exclusión molecular que la disolución resultante tiene el 0,31% de fragmentos y se determina mediante un ensayo de HCP de ELISA que tiene 578 ppm de HCP.

- Después, se cargan tubos de centrifuga de 15 ml con 25 μl, 50 μl o 100 μl de o bien resina de divinilbenceno (DVB) reticulado o bien resina de divinilbenceno-dimetacrilato de etilenglicol (DVB-EGDMA) reticulado. No se añade ningún medio a un segundo conjunto de tubos de centrifuga de 15 ml que se usan como control. Después, se añaden 5,0 ml de la disolución de MAB05 que contiene el 1,99% de fragmentos a los tubos de centrifuga. Se deja que los tubos roten durante 24 horas. Después se filtran todas las disoluciones a través de una membrana de 0,22 micrómetros (unidades de filtro de jeringa Millex®, Millex®-GV, 0,22 μm, PVDF, 33 mm, esterilizadas por radiación gamma, número de
35 catálogo: SLGV033RB, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, 01821, EE.UU.) para retirar cualquier partícula de resina que pueda quedar suspendida en disolución. La concentración del MAB05 restante en las muestras se determina mediante espectrofotómetro de UV a 280 nm. El porcentaje de fragmentos restantes en las muestras se determina
40 mediante cromatografía de exclusión molecular. La concentración de HCP restante en las muestras se determinó mediante un ensayo ELISA.

- 45 Tal como se resume en las tablas 6a, 6b y 6c a continuación, se muestra la recuperación de anticuerpo monoclonal, el porcentaje de fragmentos y la concentración de HCP en las disoluciones antes del tratamiento con las resinas hidrófobas. El experimento demuestra que el tratamiento estático de una disolución de anticuerpo monoclonal con resinas hidrófobas retira selectivamente fragmentos de anticuerpo monoclonal y HCP. A medida que se aumenta la

cantidad de resina hidrófoba añadida a la disolución de anticuerpo monoclonal, se reduce el porcentaje de fragmentos restantes en la disolución. Los datos indican el resultado inesperado de que pueden usarse resinas hidrófobas para retirar selectivamente fragmentos de anticuerpo monoclonal y HCP a partir de una disolución de un anticuerpo monoclonal en condiciones de unión estática.

- 5 Tabla 6a: Recuperación de anticuerpo monoclonal y porcentaje de fragmentos después del tratamiento estático de disolución de MAB04 con una resina hidrófoba de DVB-EGDMA.

Resina añadida (μl)	Recuperación de anticuerpo	HCP (ppm)	Porcentaje de fragmentos
0	-	578	0,31%
25	94%	14	0,15%
50	93%	8	0,10%
100	86%	4	BDL*

* Por debajo del límite de detección.

- Tabla 6b: Recuperación de anticuerpo monoclonal y porcentaje de fragmentos después del tratamiento estático de disolución de MAB04 con una resina de DVB hidrófoba reticulada.

Resina añadida (μl)	Recuperación de anticuerpo	HCP (ppm)	Porcentaje de fragmentos
0	-	578	0,31%
25	97%	12	0,12%
50	93%	4	0,03%
100	87%	4	BDL*

* Por debajo del límite de detección.

- 10 Tabla 6c: Recuperación de anticuerpo monoclonal y porcentaje de fragmentos después del tratamiento estático con una resina de DVB hidrófoba reticulada en diferentes condiciones de pH y conductividad.

pH de disolución	Conductividad [mS/cm]	Resina de DVB [μl]	Recuperación de anticuerpo [%]	Porcentaje de fragmentos, %
4,0	4,5	0	-	1,50
4,0	4,5	50	90	0,00
4,0	22	0	-	1,49
4,0	22	50	82	0,16
5,0	4,5	0	-	1,70
5,0	4,5	50	92	0,12
5,0	22	0	-	1,52
5,0	22	50	89	0,15
6,0	4,5	0	-	1,69
6,0	4,5	50	88	0,35
6,0	22	0	-	1,54
6,0	22	50	83	0,12
7,0	4,5	0	-	1,53
7,0	4,5	50	88	0,24
7,0	22	0	-	1,52
7,0	22	50	84	0,11
8,0	4,5	0	-	1,74
8,0	4,5	50	86	0,22
8,0	22	0	-	1,68
8,0	22	50	83	0,12
9,0	4,5	0	-	1,72
9,0	4,5	50	87	0,17
9,0	22	0	-	1,69
9,0	22	50	83	0,15

Ejemplo 15:

La aplicación de resinas hidrófobas para la retirada de HCP a partir de diversas disoluciones tras proteína A de un anticuerpo monoclonal en condiciones dinámicas

- 15 En este experimento, se evaluó material particulado que consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (PS-DVB) (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (PS-DVB-EGDMA) (30%) para determinar su capacidad para retirar HCP a partir de diversas combinaciones de anticuerpo tras proteína A. Las combinaciones tras proteína A se generan usando materiales Prosep® Ultra Plus o Mab Select Sure® o Eshmuno® A comercialmente disponibles, en los que se carga cultivo celular aclarado que contiene anticuerpo de interés en columna de proteína A reequilibrada hasta

valores de capacidad de unión de 40 mg/ml a 600 cm/h y después se lava con tampón de reequilibrado y disolución de NaCl 0,5 M durante 5 CV siguiendo la elución de 5 CV usando glicina 50 mM y tampón de ácido acético 50 mM a pH 3,5. Después se cargan las combinaciones recogidas en el material particulado que consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (PS-DVB) (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (PS-DVB-EGDMA) (30%).

5 Se realizan mediciones en modo dinámico, de empaquetar el material particulado en la columna cromatográfica y cargarlo con alimentación de anticuerpos tras proteína A (pH 5,0) a 600 cm/h después del equilibrado con tampón de acetato 50 mM pH 5,0, LF ~2 mS/cm durante >20 CV. Se cuantificaron los niveles de anticuerpo mediante SEC-HPLC y la cantidad de HCP mediante mediciones de ELISA (véase la figura 10):

10 Figura 10a: niveles de HCP en diversas combinaciones de mAb03 tras proteína A (por ejemplo Prosep® Ultra Plus (PUP), Mab Select Sure®, Eshmuno® A) después de diferentes cargas en material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que este material consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%).

15 Figura 10b: niveles de HCP en diversas combinaciones de mAb07 tras proteína A (por ejemplo Prosep® Ultra Plus (PUP), Mab Select Sure®, Eshmuno® A) después de diferentes cargas en material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que este material consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%).

Ejemplo 16:

La aplicación de resinas hidrófobas para la retirada de HCP a partir de disoluciones tras proteína A que contienen sal de un anticuerpo monoclonal en condiciones dinámicas

20 En el siguiente experimento, se evalúa material particulado, que consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (PS-DVB) (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (PS-DVB-EGDMA) (30%), para determinar su capacidad para retirar HCP a partir de combinaciones de anticuerpos tras proteína A que contienen sal. Se realizan mediciones en modo dinámico, de empaquetar el material particulado en la columna cromatográfica y cargarlo con alimentación de anticuerpos tras proteína A que contienen sal (por ejemplo NaCl 0,5 M) (pH 5,0) a 600 cm/h después del equilibrado con tampón de acetato 50 mM pH 5,0, LF ~2 mS/cm durante >20 CV. Se cuantifican los niveles de anticuerpos mediante SEC-HPLC y la cantidad de HCP mediante mediciones de ELISA (véase la figura 11):

30 Figura 11: niveles de punto de inflexión de HCP de mAb03 a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que en un experimento se añadió NaCl hasta una concentración de 0,5 M. El material 30451 consiste en poliestireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno, el material 30410 consiste en poliestireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%).

Ejemplo 17

35 En este experimento, se evalúa material particulado que consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (PS-DVB) (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (PS-DVB-EGDMA) (30%) en comparación con material hidrófobo comercialmente disponible para determinar su capacidad para retirar HCP a partir de diversas combinaciones de anticuerpo tras proteína A. Se realizan mediciones en modo dinámico, de empaquetar el material particulado en la columna cromatográfica y cargarlo con alimentación de anticuerpos tras proteína A (pH 5,0) a 900 cm/h después del equilibrado con tampón de acetato 50 mM pH 5,0, LF ~2 mS/cm durante >20 CV. Se cuantifican los niveles de anticuerpos mediante SEC-HPLC y la cantidad de HCP mediante mediciones de ELISA (véase la figura 12):

40 Figura 12: niveles de punto de inflexión de HCP de mAb03 a diferentes cargas para material particulado de PS-DVB-EGDMA, en la que el material 30410 consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (30%). P242 es material hidrófobo de competencia, P248 es material hidrófobo de competencia.

Ejemplo 18

45 La aplicación de resina de PS-DVB-EGDMA para la retirada de proteína A en condiciones estáticas

Este ejemplo demuestra que puede retirarse selectivamente proteína A a partir de una disolución mediante tratamiento estático con resina de PS-DVB-EGDMA en diversas condiciones de pH.

Se preparan dos disoluciones que contienen proteína A:

50 a) se disuelven aproximadamente 2 mg/ml de proteína A en tampón de acetato-fosfato 25 mM que contiene NaCl 50 mM pH 4,00

b) se disuelven aproximadamente 2 mg/ml de proteína A en tampón TRIS 50 mM que contiene NaCl 50 mM pH 8,00.

Después se filtran las disoluciones preparadas a través de una membrana de 0,22 μm (Stericup®-GP con una membrana Millipore Express® PLUS de 0,22 μm , 250 ml, número de catálogo: SCGPU02RE, EMD Millipore Corp. Billerica, MA, 01821, EE.UU.) y después se tratan con uno de tres tipos diferentes de resinas (por ejemplo resina de DVB-EGDMA, Eshmuno® S, Eshmuno® Q) en condiciones estáticas, tal como se describe a continuación.

- 5 Se cargan viales Eppendorf de 1,5 ml con 200 μl de resina de PS-DVB-EGDMA, 200 μl de Eshmuno® S, 200 μl de Eshmuno® Q (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Después, se añade 1 ml de la disolución de proteína A preparada a los viales Eppendorf preparados. Se dejan agitar los viales durante 20 horas. Después se someten todos los tubos a centrifugación y se filtran a través de una membrana de 0,22 micrómetros (unidades de filtro de jeringa Millex®, Millex®-GV, 0,22 μm , PVDF, 33 mm, esterilizadas por radiación gamma, número de catálogo: SLGV033RB, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, 01821, EE.UU.) para retirar cualquier perla que pueda quedar suspendida en disolución. La cantidad de la proteína A restante en las muestras se determina mediante adsorción fotométrica a 280 nm y se somete adicionalmente al análisis de SDS-PAGE.

- 15 Tal como se resume en la tabla 7 a continuación, este experimento demuestra que es posible adsorber selectivamente proteína A a partir de una disolución ajustada a diferentes valores de pH mediante tratamiento estático con diferentes tipos de perlas. Aunque Eshmuno® S adsorbió proteína A en una disolución a pH 4,00, no logró adsorber proteína A en una disolución a pH 8,00. Adicionalmente, Eshmuno® Q pudo adsorber proteína A en una disolución a pH 8,00, pero no lo logró a pH 4,00. Sorprendentemente, los datos indican el resultado inesperado de que la resina de PS-DVB-EGDMA puede adsorber proteína A en disoluciones a pH 4,00 y pH 8,00 en condiciones de unión estática.

- 20 Tabla 7: Niveles de proteína A después del tratamiento estático con tres tipos de resina diferentes en dos condiciones de pH diferentes.

Medios	Cantidad de medios	pH	Adsorción UV de disolución después de unión estática	Concentración de proteína A en disolución después de unión estática [mg/ml]
Condiciones de partida	-	4,00	0,343	2,05
Condiciones de partida		8,00	0,325	1,95
Eshmuno® S	200 μl	4,00	0,001	0,01
Eshmuno® S	200 μl	8,00	0,313	1,87
Eshmuno® Q	200 μl	4,00	0,373	2,23
Eshmuno® Q	200 μl	8,00	0,052	0,31
Resina de PS-DVB-EGDMA	200 μl	4,00	0,026	0,16
Resina de PS-DVB-EGDMA	200 μl	8,00	0,022	0,13

Figura 13: Análisis de SDS-PAGE reducido de adsorción de proteína A en resinas DVB-EGDMA, Eshmuno® S y Eshmuno® Q según el ejemplo 18 con

M = marcador PerfectProtein™,

PA = disolución de partida (proteína A 2 mg/ml),

- 25 S = sobrenadante después de la adsorción en Eshmuno®S,

Q = sobrenadante después de la adsorción en Eshmuno®Q,

P = sobrenadante después de la adsorción en DVB-EGDMA

Ejemplo 19:

- 30 La aplicación de resinas hidrófobas para la retirada de HCP a partir de disoluciones tras proteína A de un anticuerpo monoclonal en condiciones dinámicas en combinación con materiales de intercambio iónico

- 35 En este experimento, se evalúa material particulado que consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (PS-DVB) (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (PS-DVB-EGDMA) (30%) (área de superficie de 686,75 m²/g, tamaño de poro promedio de 14 nm, y tamaño de partícula promedio de 41 μm) para determinar su capacidad para retirar HCP a partir de combinaciones de anticuerpos tras proteína A. Las combinaciones tras proteína A se generan usando Prosep® Ultra Plus comercialmente disponible, en el que se carga cultivo celular aclarado que contiene anticuerpo de interés en columna de proteína A reequilibrada hasta valores de capacidad de unión de 40 mg/ml a 600 cm/h y después se lavan con tampón de reequilibrado durante 5 CV siguiendo a la elución de 5 CV usando glicina 50 mM y tampón de ácido acético 50 mM a pH 3,5. Después se cargan las combinaciones recogidas en el material particulado que consiste en poli(etil)estireno (m), reticulado con copolímeros de divinilbenceno (PS-DVB) (70%) y dimetilacrilato de etilenglicol (PS-DVB-EGDMA) (30%), Eshmuno®CPX, Eshmuno®Q de manera individual y en combinación, conectando directamente todos los dispositivos. Se realizan mediciones en modo dinámico, de empaquetar el material particulado en la columna cromatográfica y cargarlo con alimentación de anticuerpos tras proteína A (pH 6,75, conductividad ~ 2,7 mS/cm, cantidad de HCP ~1000 ng/ml HCP) a 600 cm/h después del

equilibrado con tampón fosfato 20 mM pH 6,75, LF ~4 mS/cm durante >20 CV. En el caso del ejemplo en combinación, se conectaron todos los dispositivos uno después de otro en una secuencia de: PS-DVB-EGDMA seguido por Eshmuno®CPX seguido por Eshmuno®Q. Se cuantificaron los niveles de anticuerpo mediante SEC-HPLC y la cantidad de HCP mediante mediciones de ELISA (véase la tabla 8):

5 Tabla 8: Niveles de HCP (ppm) después del tratamiento dinámico con tres tipos de resina diferentes de manera individual y en combinación.

Carga (mg/ml)*	Nivel de HCP (ppm) después del tratamiento dinámico con diversos materiales			
	Resina de PS-DVB-EGDMA	Eshmuno® CPX	Eshmuno® Q	Todos combinados en uno
350	39,8	72,14	11,17	1,73
500	49,8	63,27	12,49	2,14
650	44,2	73,27	10,39	2,3
750	55,6	78,30	12,86	2,36
900	123,6	89,7	10,29	2,83
1200	-	-	-	3,05
1500	-	-	-	3,09

* cargas de anticuerpos calculadas por volumen de resina. En el caso del ejemplo en combinación, todas las columnas usadas tenían el mismo volumen, pero la carga tiene en cuenta la primera columna (resina de PS-DVB-EGDMA).

REIVINDICACIONES

1. Método para la separación de proteínas de células huésped (HCP), fragmentos de anticuerpo y sustancias de bajo peso molecular a partir de disoluciones que contienen anticuerpos, caracterizado porque
- 5 una disolución acuosa de cultivo celular aclarado, que tiene un valor de pH en el intervalo de 5 - 9, y una conductividad en el intervalo de 2 - 50 mS/cm, y que contiene anticuerpos, se pone en contacto durante un periodo de tiempo con un material de cromatografía hidrófobo
- en una columna de cromatografía líquida que tiene un diámetro que oscila entre 1 y 100 cm, preferiblemente en el intervalo de 5 a 50 cm, mediante lo cual la columna se hace funcionar a presiones de hasta 100 bar, preferiblemente a una presión que oscila entre 0,2 y 80 bar y
- 10 mediante lo cual los anticuerpos permanecen en disolución y las HCP, fragmentos de anticuerpo y sustancias de bajo peso molecular se adsorben por el material de cromatografía hidrófobo, que es un material de separación particulado, rígido, que tiene diámetros medios de partícula en el intervalo de 10 μ m a 600 μ m, preferiblemente en el intervalo de 20 μ m a 150 μ m, lo más preferido en el intervalo de 20 μ m a 63 μ m, y que tiene tamaños de poro en el intervalo de 4 - 500 nm, preferiblemente en el intervalo de 10 - 30 nm, lo más preferido en el intervalo de 13 nm a 25 nm
- 15 y en el que se aplica material de cromatografía particulado, que consiste en poliestireno o poli(etil)estireno, que está reticulado con copolímero de divinilbenceno y dimetacrilato de etilenglicol en una razón de desde el 98 : 2 hasta el 10 : 90% en peso.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la disolución acuosa se hace pasar a través a una velocidad de flujo en el intervalo de 150 - 1000 cm/min, preferiblemente en el intervalo de 300 - 900 cm/min.
- 20 3. Método según una o más de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque la separación se procesa después de la etapa de unión por afinidad a proteína A.
4. Método según una o más de las reivindicaciones 1 - 3, caracterizado porque la secuencia de tratamientos de purificación incluye un tratamiento con resina de intercambio iónico.
- 25 5. Método según una o más de las reivindicaciones 1 - 4, caracterizado porque se combina al menos un tratamiento de separación con una resina de intercambio iónico, específica para la separación de proteína A, con un tratamiento con perlas de polímero hidrófobo porosas tal como se caracteriza en la reivindicación 1 dando como resultado un agotamiento de hasta <10 ng de HCP y retirada de proteína A lixiviada.
6. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque se combina(n) tratamiento(s) con resina(s) de intercambio iónico, específica(s) para la separación de proteína A, con un tratamiento con perlas de polímero hidrófobo que consisten en resina de vinilbenceno reticulado, poli(etil)estireno-divinilbenceno o en poliestireno-divinilbenceno-dimetilacrilato de etilenglicol.
- 30

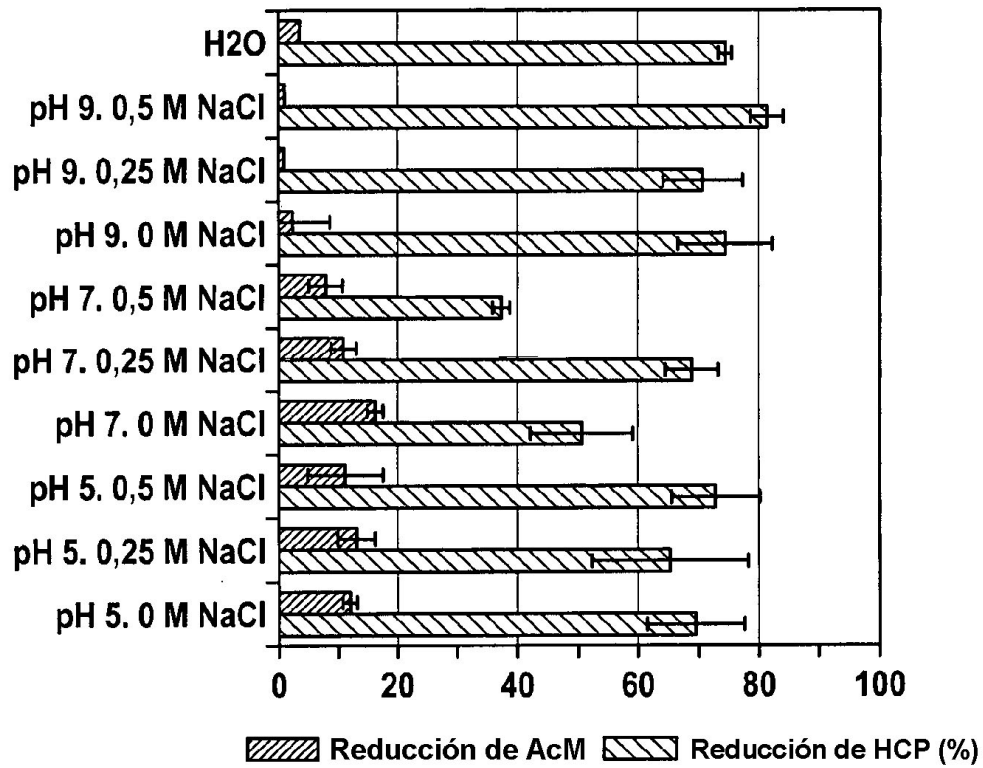
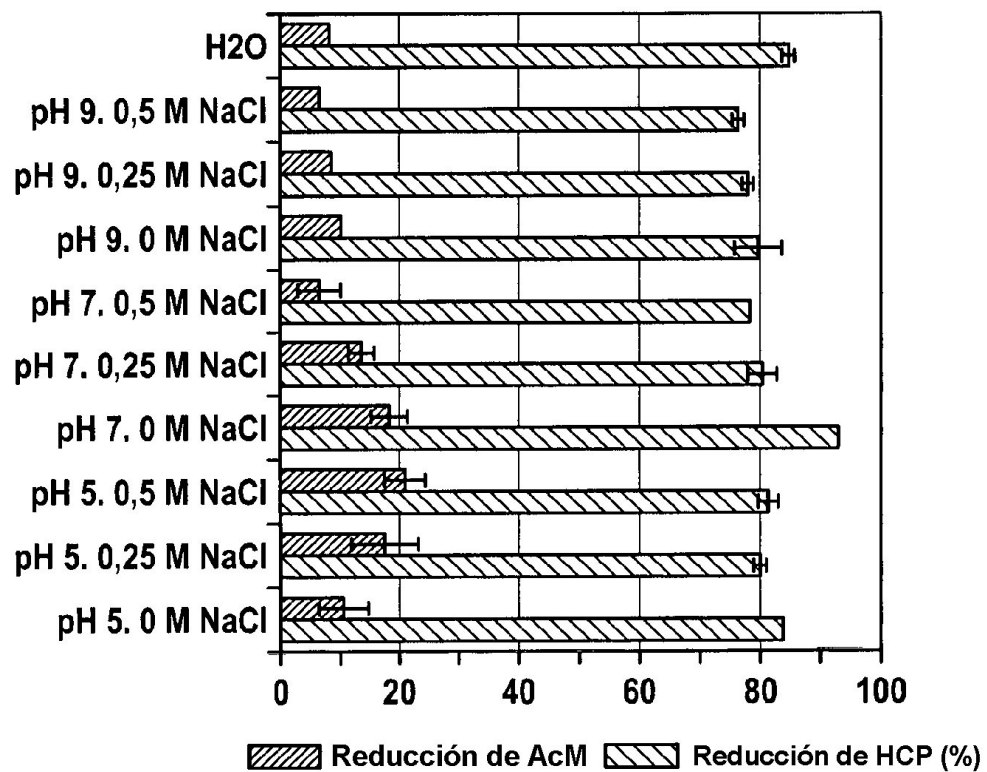
Fig. 1a**Fig. 1b**

Fig. 1c

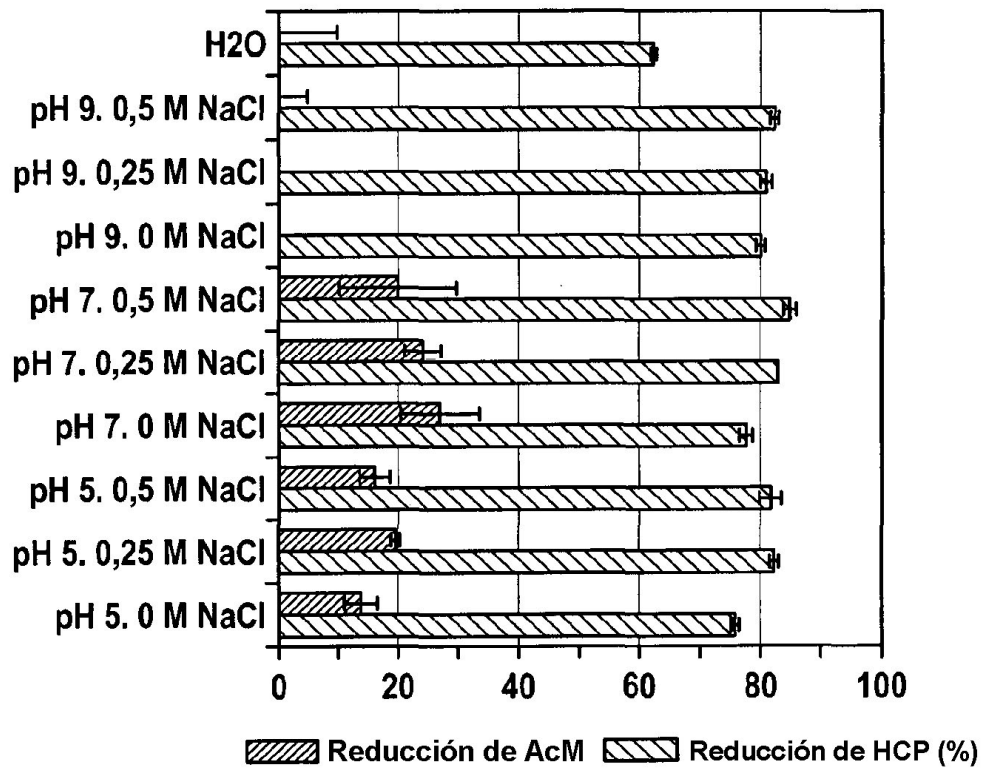


Fig. 1d

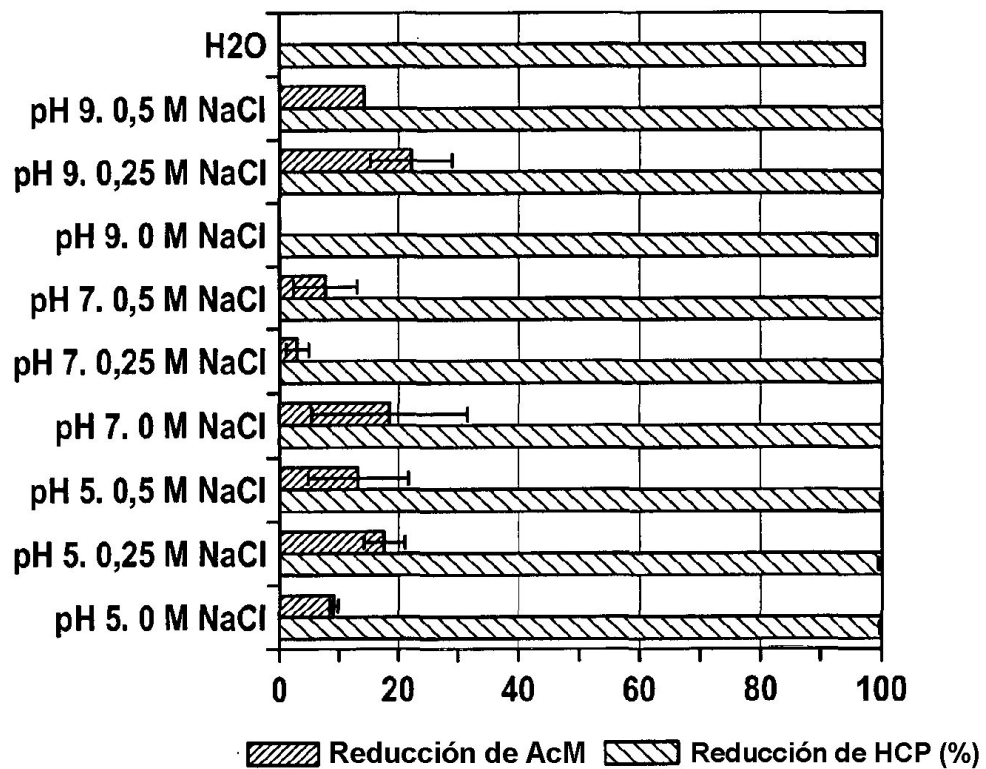


Fig. 2a

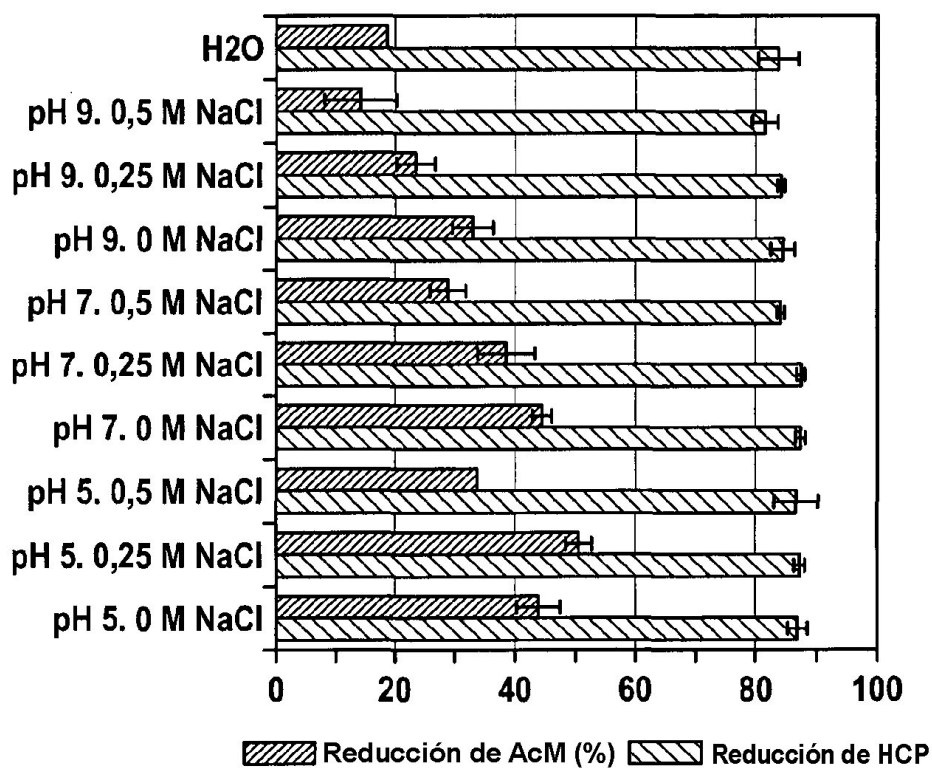


Fig. 2b

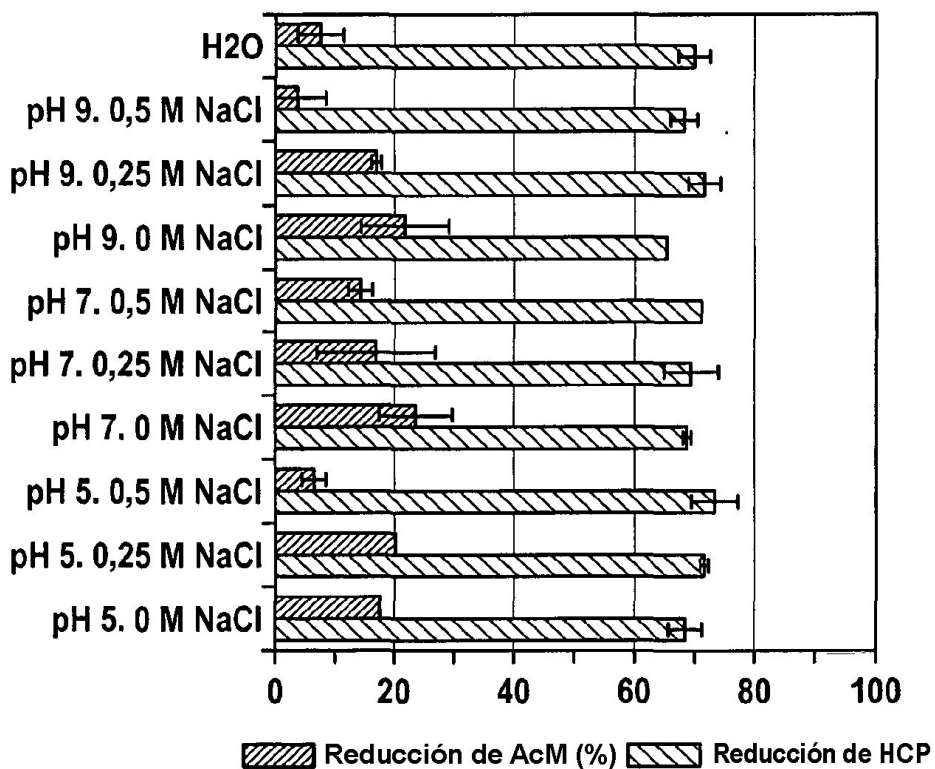


Fig. 2c

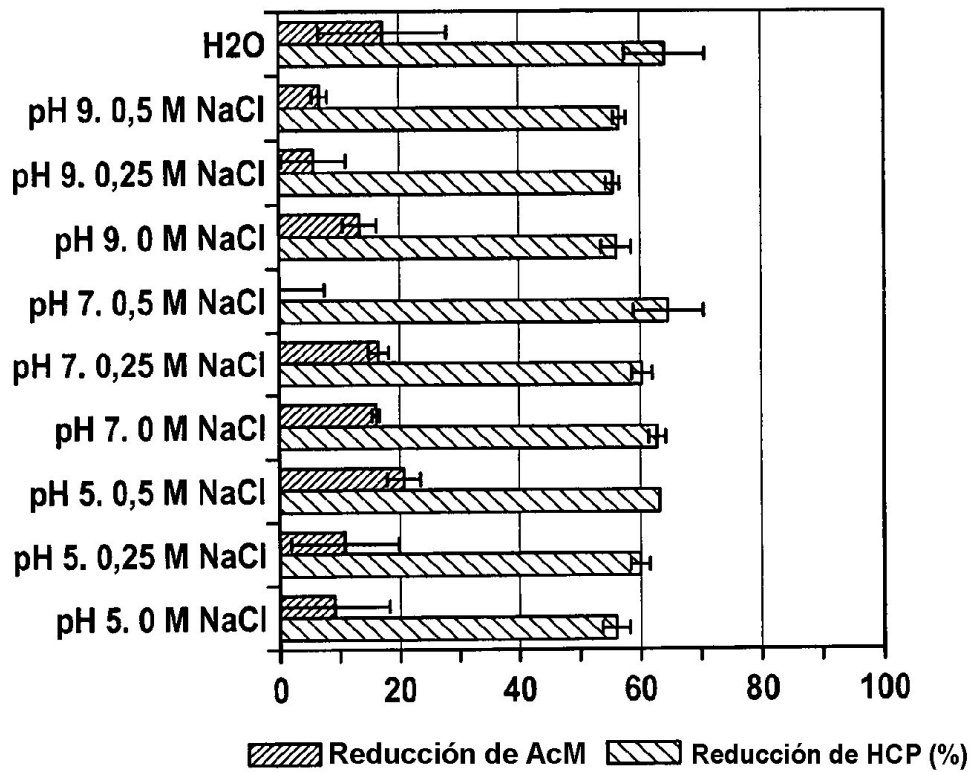


Fig. 3

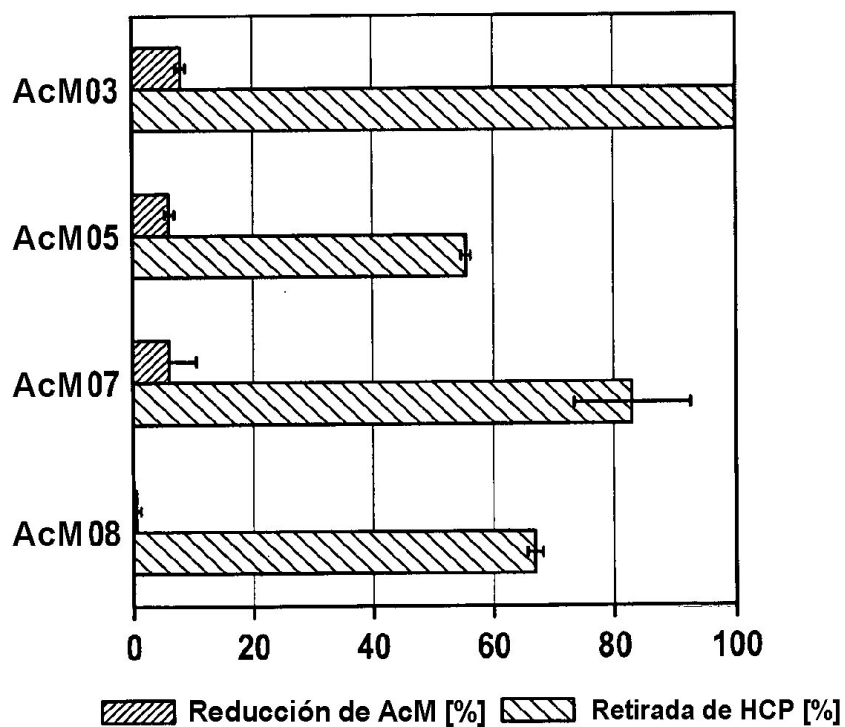


Fig. 4

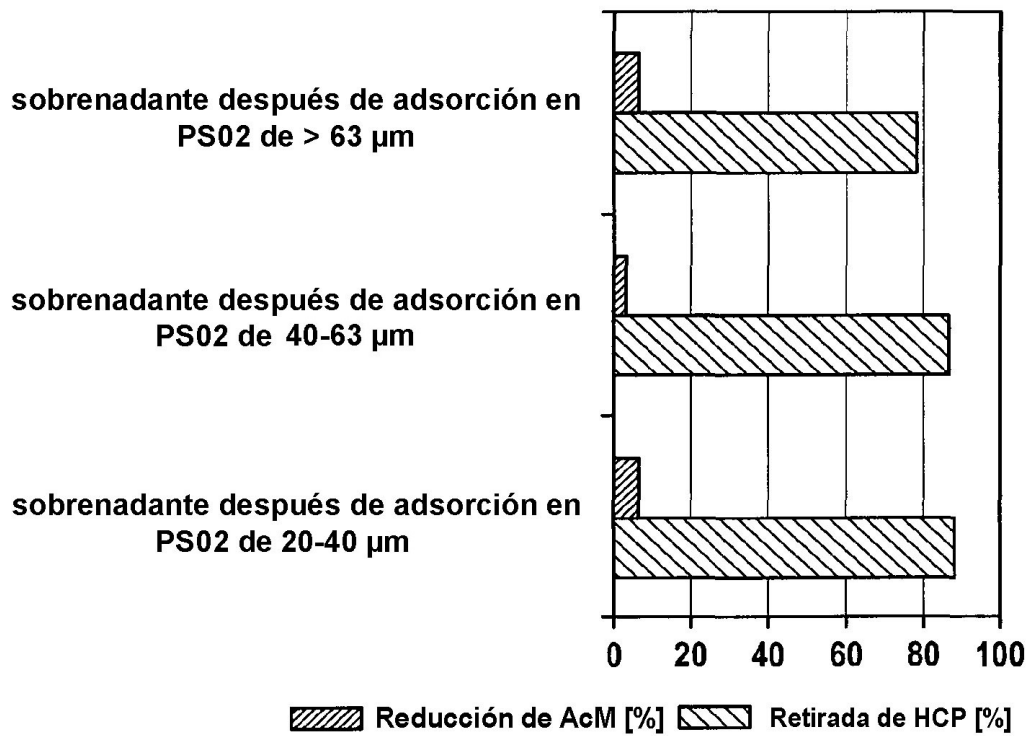


Fig. 5

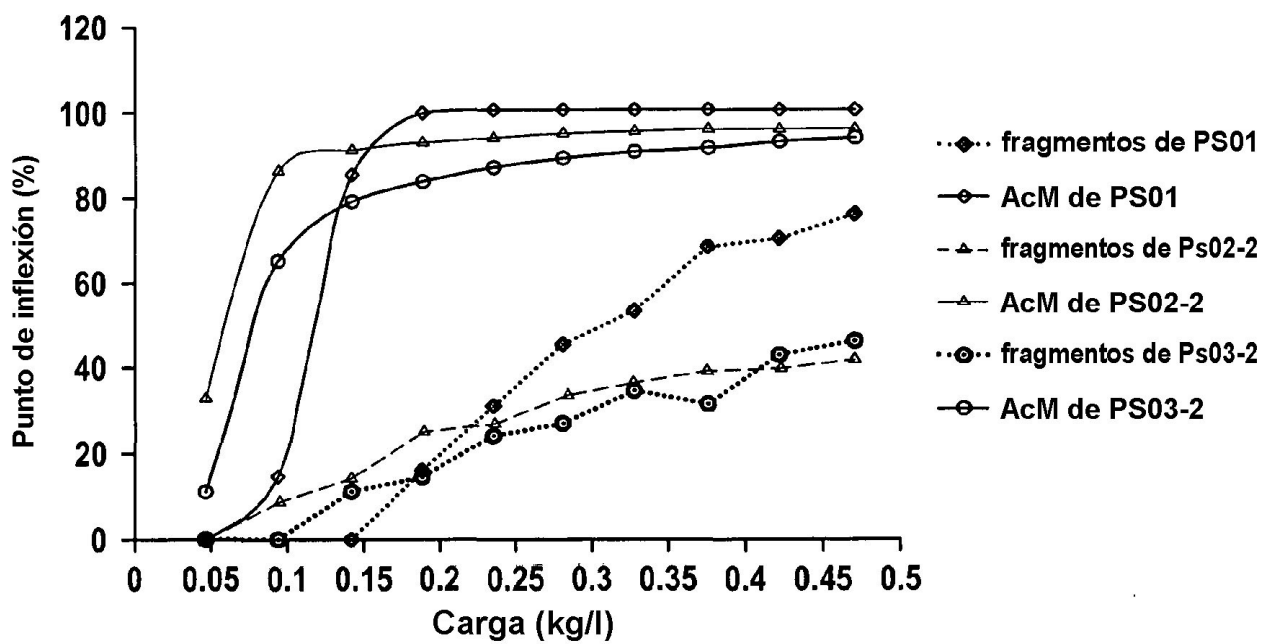


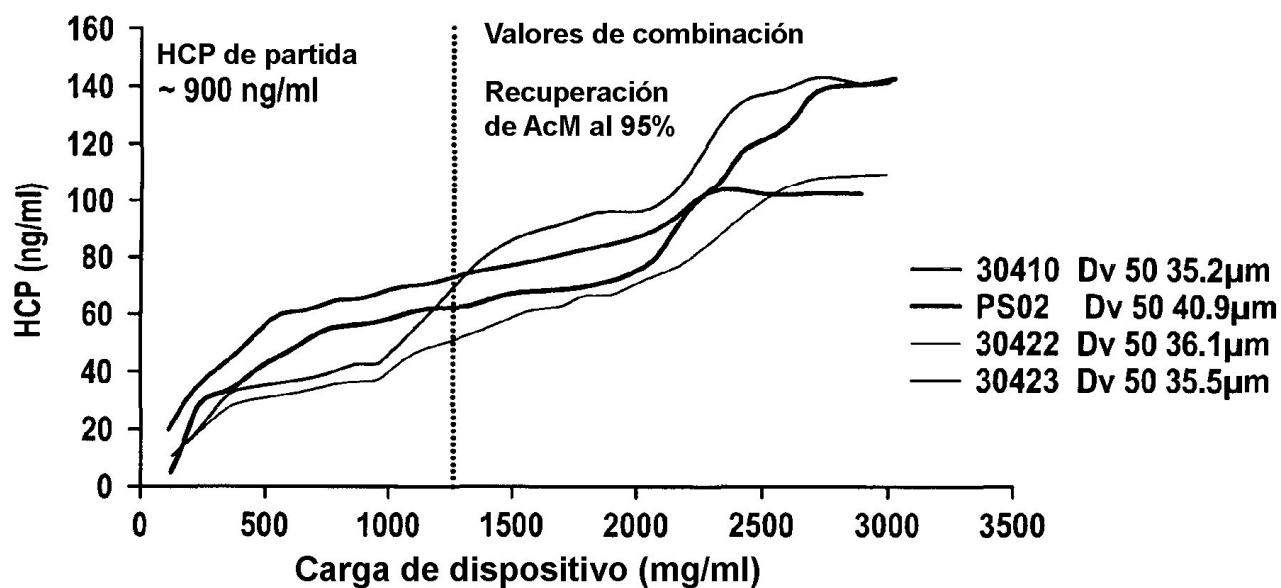
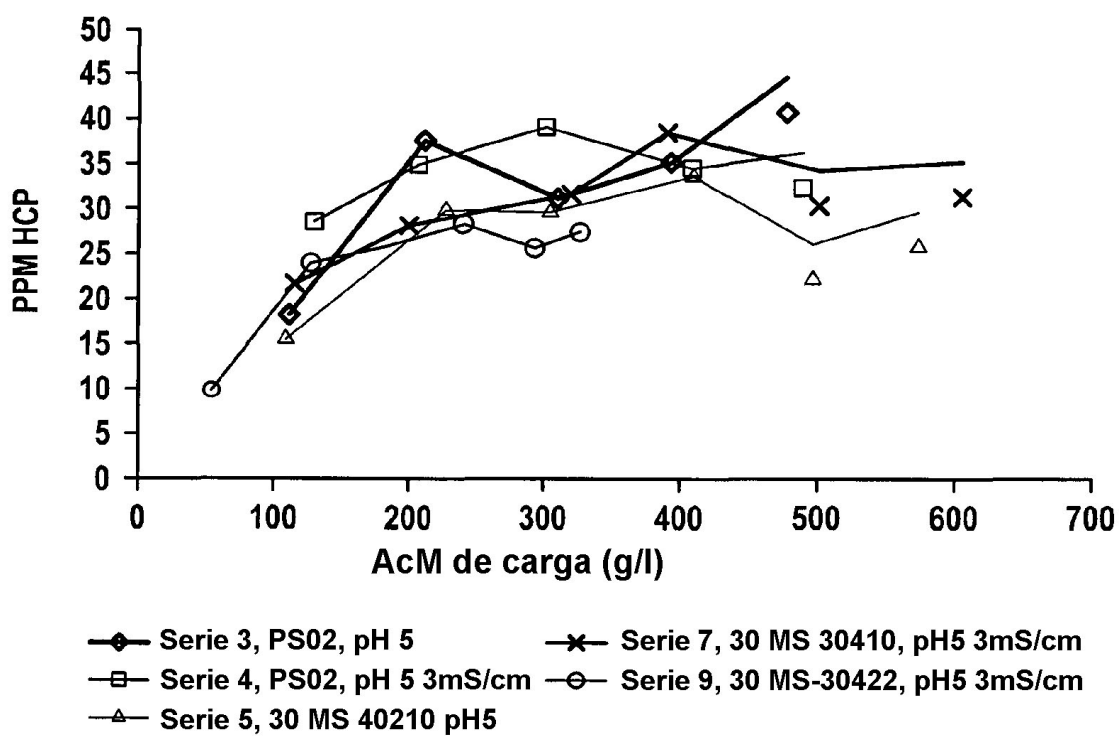
Fig. 6**Fig. 7a**

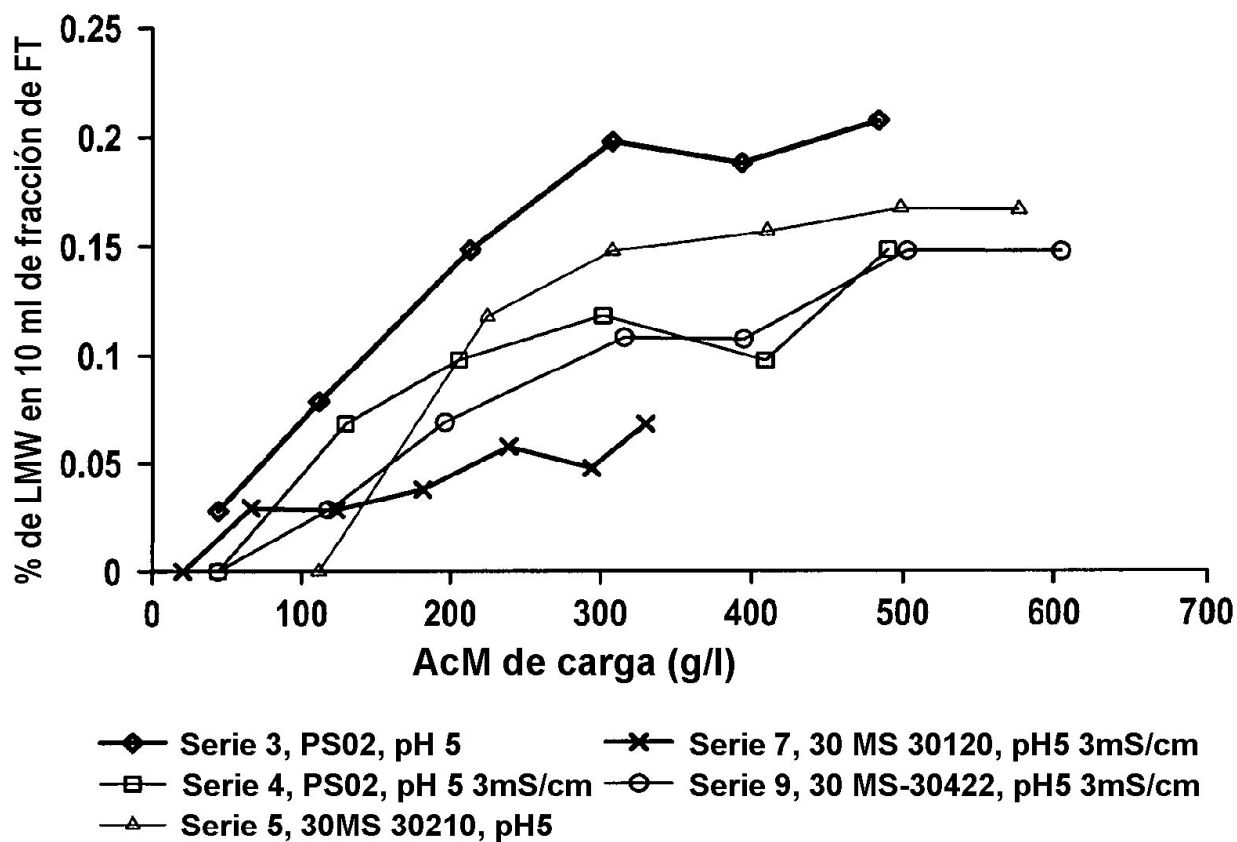
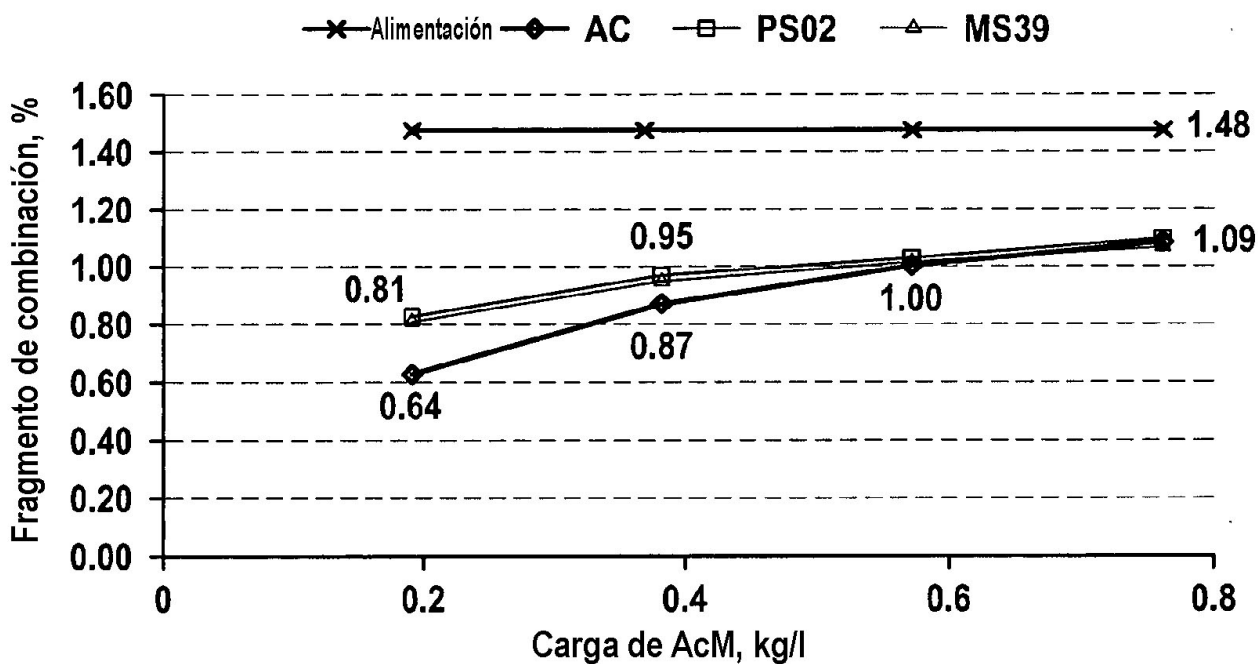
Fig. 7b**Fig. 7c**

Fig. 7d

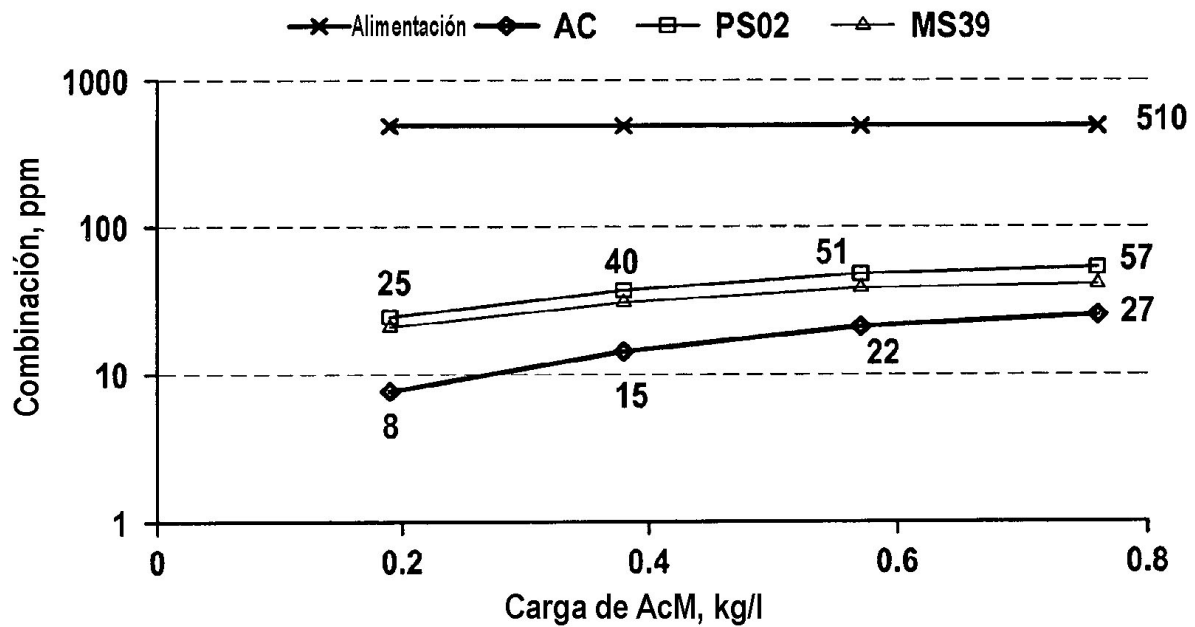


Fig. 8

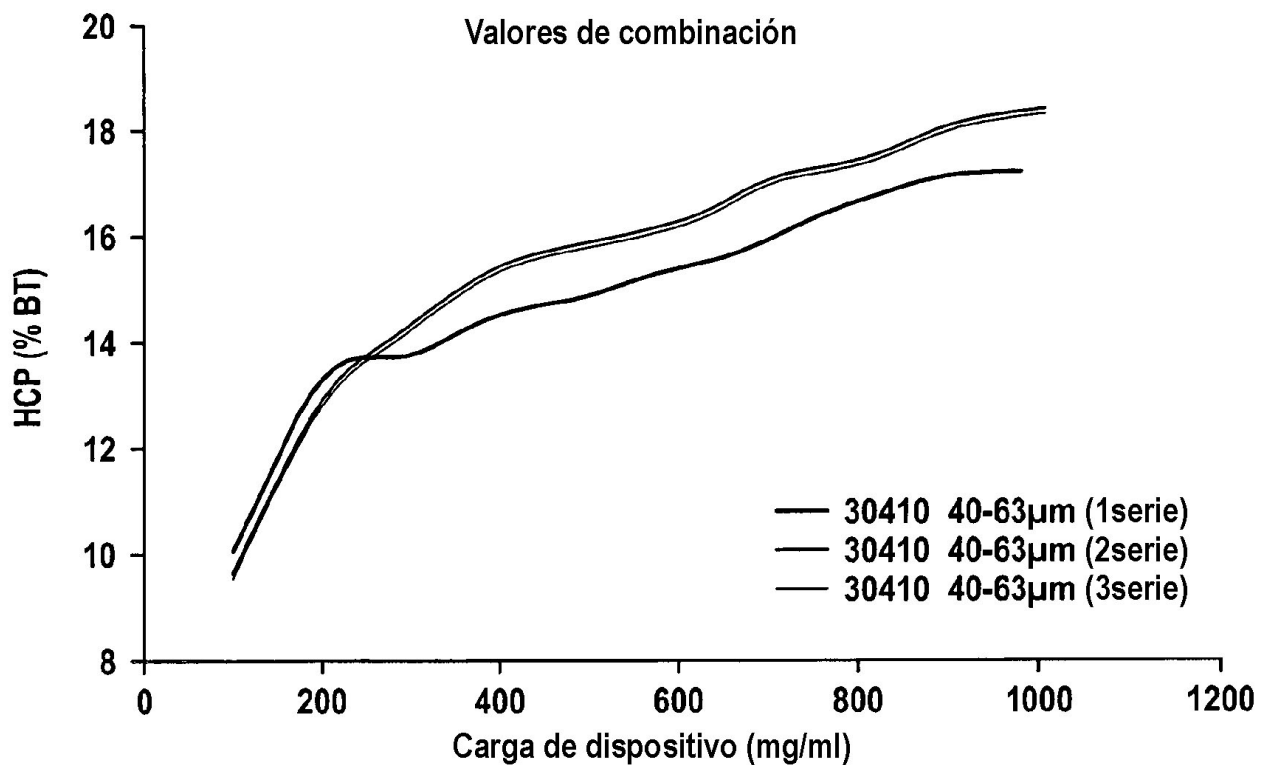


Fig. 9

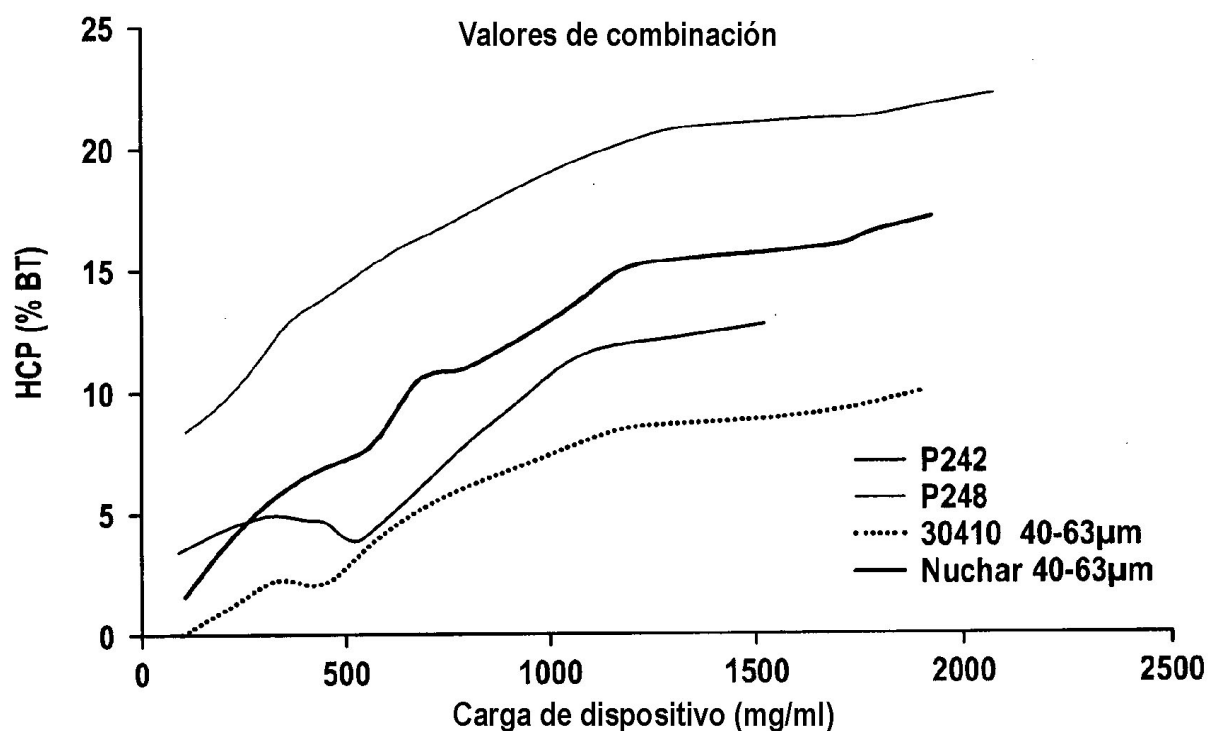


Fig. 10a

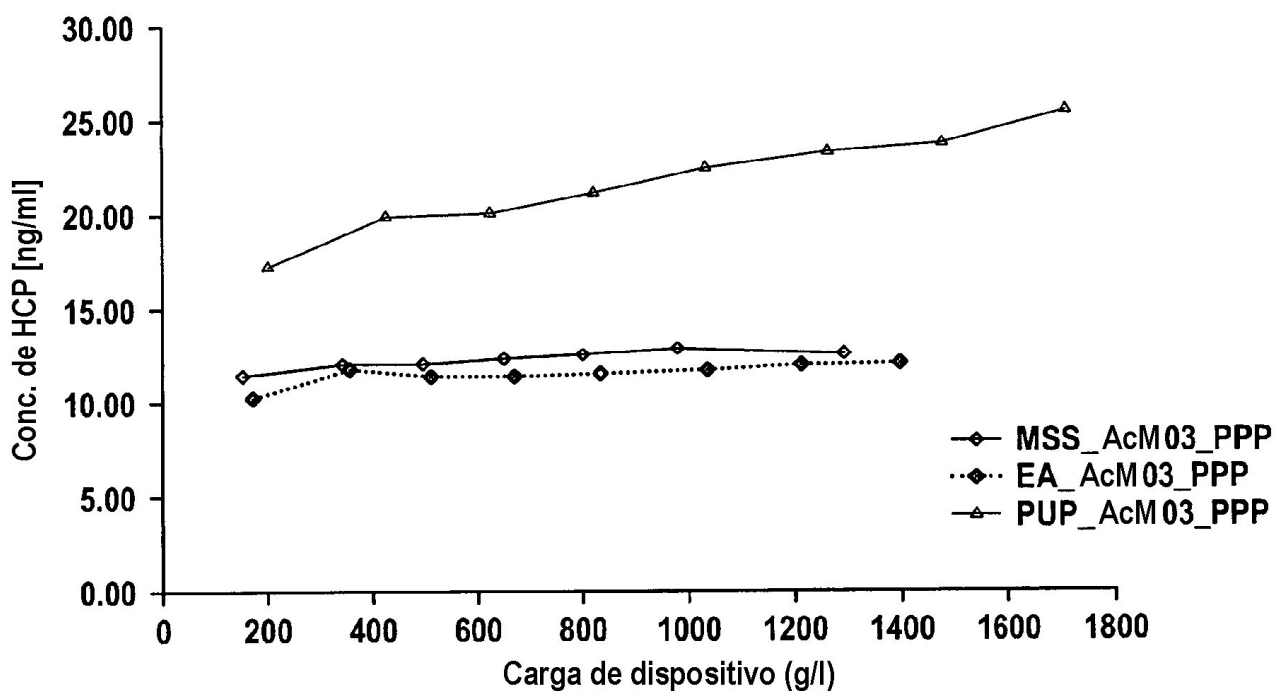


Fig. 10b

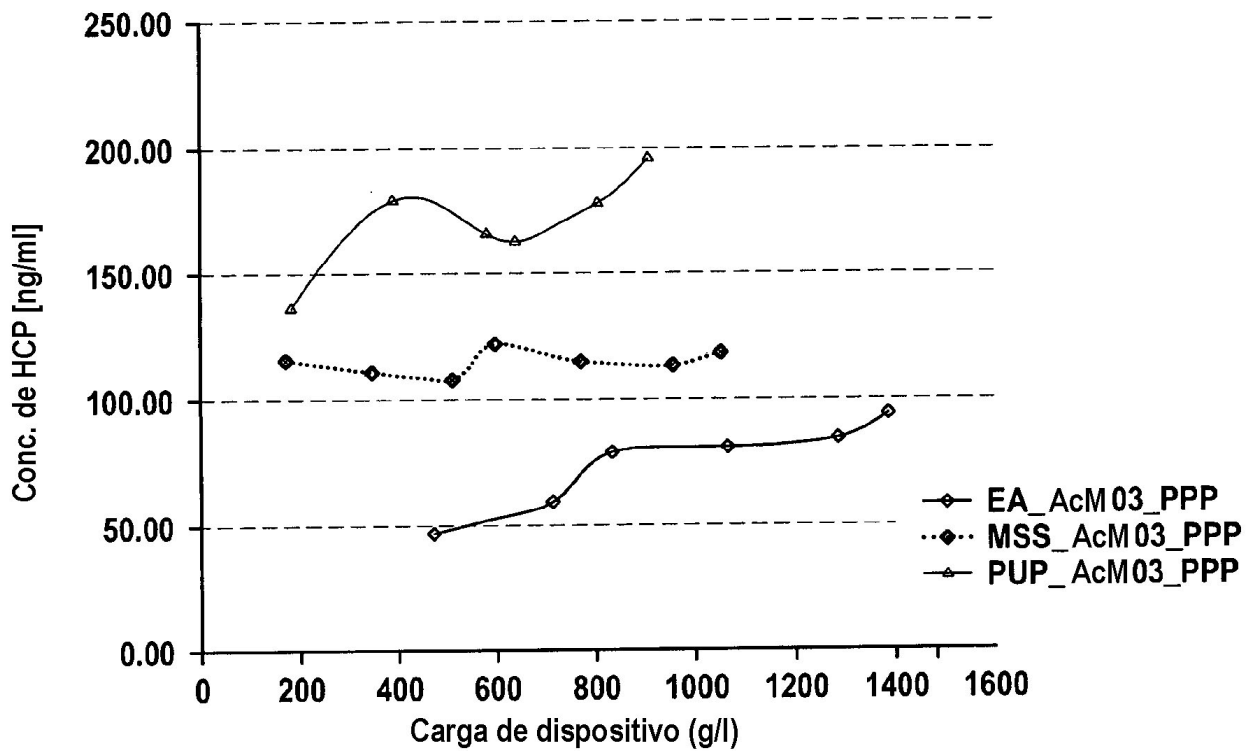


Fig. 11

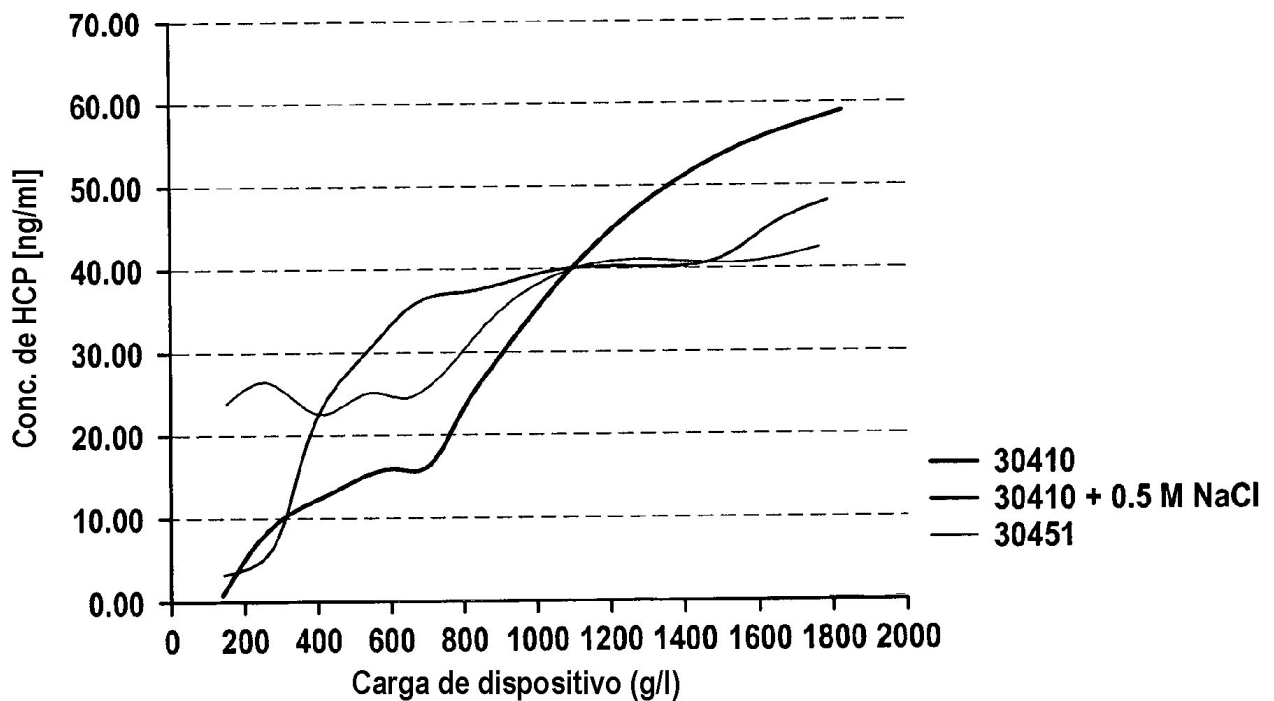


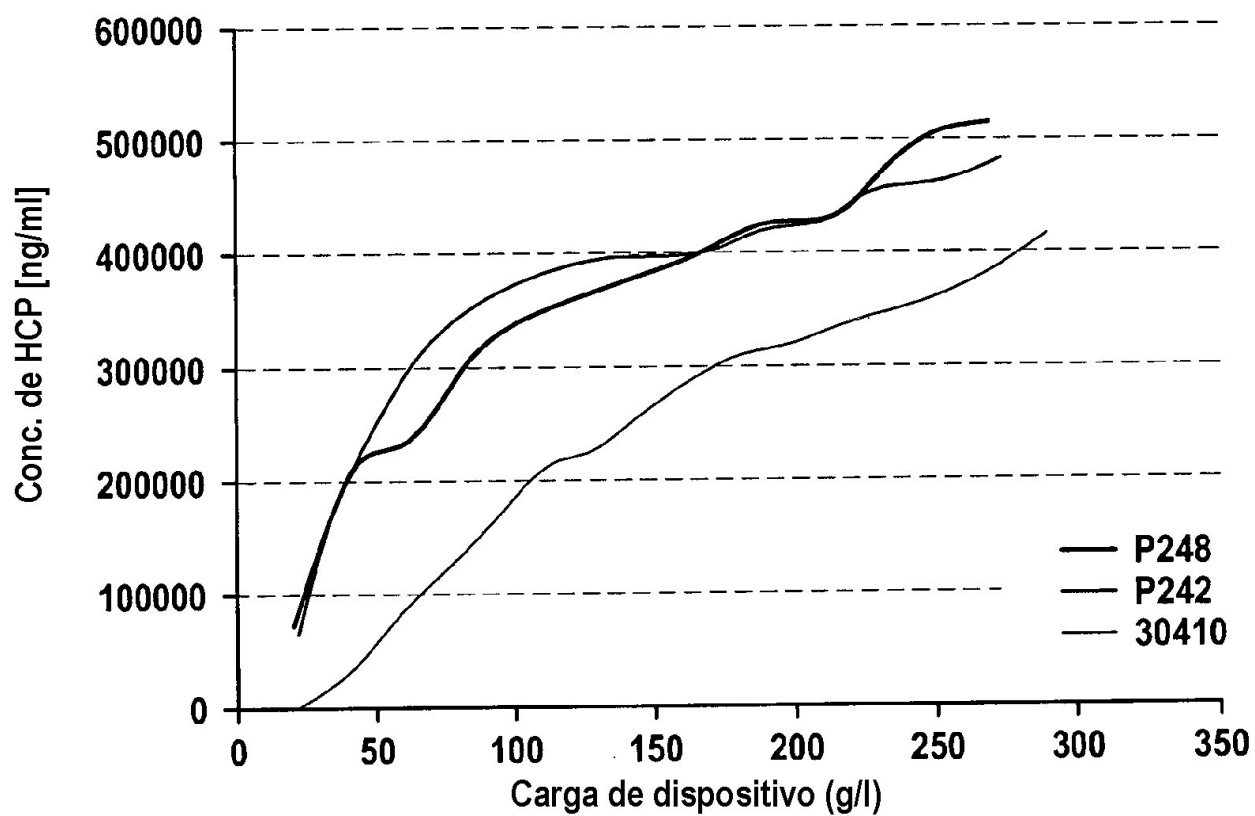
Fig. 12

Fig. 13