



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 332 893**

51 Int. Cl.:

**B01J 20/32** (2006.01)

**B01D 15/00** (2006.01)

**B01J 20/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03078126 .4**

96 Fecha de presentación : **01.09.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **1386660**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.2004**

54 Título: **Aislamiento de inmunoglobulinas.**

30 Prioridad: **30.08.1996 DK 932/96**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.02.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.02.2010**

73 Titular/es: **UPFRONT CHROMATOGRAPHY A/S**  
**Lersoe Parkallé 42**  
**2100 Copenhagen Ø, DK**

72 Inventor/es: **Lihme, Allan Otto Fog y**  
**Hansen, Marie Bendix**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Aislamiento de inmunoglobulinas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para aislar o purificar inmunoglobulinas a partir de diferentes materias primas y a matrices en fase sólida para el mismo.

10 **Antecedente de la invención**

Las inmunoglobulinas -o los anticuerpos- constituyen una clase muy importante de proteínas que están presentes en diferentes fluidos corporales de mamíferos, de aves y de peces y que actúan como agentes protectores del animal contra sustancias, bacterias y virus que desafían al animal. Las inmunoglobulinas están presentes típicamente en la sangre, la leche y la saliva de animales, así como en otros fluidos corporales y secreciones.

La actividad biológica, que poseen las inmunoglobulinas, se explota en la actualidad en un abanico de diferentes aplicaciones en el diagnóstico humano y veterinario, en el sector sanitario y en el terapéutico.

20 *Diagnósticos*

Los anticuerpos se han aplicado durante muchos años como una herramienta analítica importante en relación con la detección y la cuantificación de una amplia variedad de sustancias relevantes en el diagnóstico de enfermedades y que tienen una importancia en aumento en áreas tales como el control de calidad de productos alimenticios, el control medioambiental, el abuso de fármacos y la vigilancia y el control de procesos industriales.

Para estos fines, los anticuerpos deseados se pueden producir mediante hiperinmunización de animales hospedadores adecuados, tales como conejos y ovejas o, alternativamente, produciendo anticuerpos monoclonales en cultivos de células de hibridoma.

Después de la producción primaria de los anticuerpos en un animal hospedador o en un cultivo celular, el anticuerpo se aísla típicamente de la masa de las otras sustancias en la materia prima, mediante un cierto tipo de procedimiento de aislamiento. Este es necesario para evitar la interferencia de estas otras sustancias con la actividad del anticuerpo, en la aplicación analítica.

35 *Aplicaciones sanitarias y terapéuticas*

La inmunización pasiva mediante inyección intramuscular de concentrados de inmunoglobulina es una aplicación bien conocida para la protección temporal contra enfermedades infecciosas, que se aplica típicamente cuando una persona está viajando de una parte del mundo a la otra. El éxito de este tipo de tratamiento en los seres humanos, se está siguiendo ahora en el campo veterinario, en donde se está aplicando y desarrollando la inmunización pasiva de ganado, caballos, cerdos y pollos recién nacidos, para mejorar la tasa de supervivencia de estos animales durante sus primeras semanas de vida. Una cuestión importante en este campo, es por supuesto el coste de tal tratamiento, que depende en un alto grado del coste de la producción del concentrado de inmunoglobulina.

Material aislado de inmunoglobulinas animales, p. ej., de la leche bovina, también se está investigando como un producto sanitario oral o incluso terapéutico, para evitar o tratar infecciones gastrointestinales, p. ej., en pacientes con SIDA. Para tales aplicaciones, tanto el grado de pureza del producto como el coste, tienen gran importancia.

Una aplicación más sofisticada de los anticuerpos para uso terapéutico, se basa en los denominados "fármacos dirigidos hacia una diana", en donde los fármacos muy potentes se enlazan covalentemente con anticuerpos que tienen unas afinidades de unión específicas, hacia células específicas en el organismo humano, p. ej., células cancerosas. Esta técnica asegura que el fármaco esté concentrado en las células enfermas, proporcionando un efecto máximo del fármaco, sin los graves efectos secundarios que tienen lugar con frecuencia al usar la quimioterapia. Para tales fines, los anticuerpos tienen que estar controlados muy cuidadosamente y tener una alta pureza, y el modo típico de realizar la producción primaria es o bien produciendo anticuerpos monoclonales en un cultivo de células de hibridoma, o fermentando bacterias modificadas genéticamente, p. ej., *E. coli*.

60 *Aislamiento de inmunoglobulinas*

Todas las aplicaciones de las inmunoglobulinas mencionadas anteriormente, requieren un cierto tipo de aislamiento del anticuerpo a partir de la materia prima bruta, pero cada tipo de aplicación tiene sus propios requerimientos muy variados, en relación con la pureza final y los costes admisibles para el producto del anticuerpo.

Generalmente, existe una amplia gama de métodos diferentes disponibles para el aislamiento de las inmunoglobulinas, que proporcionan una amplia gama de purezas finales, de rendimientos y de costes del producto.

Los métodos tradicionales para el aislamiento de inmunoglobulinas se basan en una precipitación reversible y selectiva de la fracción proteica que comprende las inmunoglobulinas, cuando se separan de otros grupos de proteínas en la solución. Siendo los agentes de precipitación típicos, etanol, polietilenglicol, sales liotrópicas (anti-caotrópicas), tales como sulfato de amonio y fosfato potásico, y ácido caprílico.

Típicamente, estos métodos de precipitación proporcionan productos muy impuros, y al mismo requieren mucho tiempo y son laboriosos. Además, la adición del agente precipitante a la materia prima, dificulta el uso del material sobrenadante para otros fines y crea un problema de eliminación. Esto es particularmente relevante cuando se trata de una purificación de inmunoglobulinas a gran escala, p. ej., a partir del suero y del plasma.

La cromatografía de intercambio iónico es otro método bien conocido para el fraccionamiento de proteínas, que se emplea con frecuencia para aislar inmunoglobulinas. Sin embargo, este método no es aplicable generalmente debido a las restricciones en la fuerza iónica y el pH, que son necesarios para asegurar una unión eficaz del anticuerpo, junto con los puntos isoelectricos que varían de diferentes inmunoglobulinas.

La cromatografía de afinidad de la proteína A y la proteína G son métodos muy populares y extendidos para el aislamiento y la purificación de inmunoglobulinas, particularmente para el aislamiento de anticuerpos monoclonales, debido principalmente a la facilidad de empleo y a la alta pureza obtenida. Aunque es popular, sin embargo se reconoce que la proteína A y la proteína G plantean otros problemas al usuario, siendo algunos de ellos: el coste muy elevado, una eficacia de la unión variable de los diferentes anticuerpos monoclonales (particularmente la IgG<sub>1</sub> de ratón), la fuga de Proteína A/Proteína G en el producto, y una estabilidad baja de la matriz con soluciones limpiadoras típicas, p. ej., hidróxido sódico 1 M. Cada uno de estos inconvenientes tiene su consecuencia específica en la aplicación individual, variando desde consecuencias insignificantes a consecuencias muy graves y costes prohibitivos.

La cromatografía hidrófoba es también un método ampliamente descrito para el aislamiento de inmunoglobulinas, p. ej., en la "Application Note 210, BioProcess Media" publicada por Pharmacia LKB Biotechnology, 1991. En esta referencia, se describe un producto del estado de la técnica, "fenil Sepharose de alto rendimiento", con el fin de purificar anticuerpos monoclonales a partir del material sobrenadante de cultivos celulares. Igual que con otras matrices hidrófobas empleadas hasta la fecha, es necesario añadir sales liotrópicas a la materia prima para que la unión de la inmunoglobulina sea eficaz. El anticuerpo unido se libera de la matriz disminuyendo la concentración de sal liotrópica en un gradiente continuo o escalonado. Se recomienda combinar la cromatografía hidrófoba con otra etapa, si se desea un producto muy puro.

La desventaja de este procedimiento es la necesidad de añadir sal liotrópica a la materia prima, ya que ésta plantea un problema de eliminación y, por tanto, un coste incrementado para el usuario a gran escala. Para otras materias primas diferentes al material sobrenadante de cultivos celulares, tales como lactosuero, plasma y yema de huevo, la adición de sales liotrópicas a las materias primas, sería en muchos casos prohibitiva en aplicaciones a gran escala, ya que la sal evitaría cualquier uso económicamente factible de materia prima pobre en inmunoglobulina, junto con el problema de la eliminación de varios miles de litros de desecho.

La cromatografía tiofílica por adsorción fue introducida por J. Porath en 1985 (J. Porath y col.; FEBS Letters, volumen. 185, pág. 306, 1985) como un nuevo principio de adsorción cromatográfico para el aislamiento de inmunoglobulinas. En este artículo, se describe cómo la divinil sulfona activaba agarosa acoplada con varios ligandos, que comprendían un grupo mercapto libre que mostraba una unión específica de las inmunoglobulinas, en presencia de sulfato de potasio 0,5 M, es decir, una sal liotrópica. Se postuló que el grupo de la sulfona, procedente del espaciador de vinil sulfona, y el tio-éter resultante en el ligando, eran una necesidad estructural para obtener la especificidad descrita y la capacidad de unión de anticuerpos. Sin embargo, más tarde se mostró que el tio-éter se podría reemplazar por nitrógeno u oxígeno, si el ligando comprendía adicionalmente un radical aromático (K.L. Knudsen y col., Analytical Biochemistry, volumen 201, pág. 170, 1992).

Aunque las matrices descritas para la cromatografía tiofílica muestran generalmente un buen rendimiento, también tienen una desventaja importante porque es necesario añadir sales liotrópicas a la materia prima, para asegurar una unión eficaz de la inmunoglobulina, lo cual es un problema por las razones enunciadas anteriormente.

Se han descrito otros ligandos tiofílicos acoplados a agarosa activada con epoxi en (J. Porath y col., Chem. Makromol. Symp., volumen. 17, pág. 359, 1988) y (A. Schwarz y col., Journal of Chromatography B, volumen 664, págs. 83-88, 1995), p. ej., 2-mercaptopiridina, 2-mercaptopirimidina y 2-mercaptotiazolina. Sin embargo, todas estas matrices de afinidad, todavía tienen constantes de afinidad inadecuadas para asegurar una unión eficaz del anticuerpo, sin adición de sales liotrópicas.

#### *Unión y aislamiento de proteínas y otras biomoléculas*

El documento de patente WO 96/00735 y el documento de patente WO 96/09116 describen resinas (matrices) para purificar proteínas y péptidos, cuyas resinas se caracterizan por el hecho de que contienen ligandos ionizables y/o funcionalidades sin carga con el pH de la unión de la proteína o el péptido diana, facilitando de tal modo interacciones hidrófobas, y cargada con el pH de la desorción, rompiendo de este modo la interacción hidrófoba establecida entre la resina y la proteína o el péptido diana. El documento WO 96/00735 menciona la posibilidad de acoplar el 2-mercaptobencimidazol con Sepharose 6 B activada con epoxi. La concentración real del ligando no está descrita, no obstante, el

acoplamiento se realiza con una Sepharose activada con epoxi en la que se describe que el contenido de grupos epoxi está en el intervalo de 1,02-1,28 mmol/g de materia seca.

El documento de patente WO 92/16292 describe una variedad de diferentes ligandos acoplados a agarosa activada con divinil sulfona y el uso de las matrices en fase sólida resultantes, para la adsorción tiorfílica de proteínas, preferentemente inmunoglobulinas. Se menciona específicamente las matrices en fase sólida que comprenden ácido 4-amino-benzoico como ligando sobre una agarosa activada con divinil sulfona. La adsorción de las proteínas, preferentemente inmunoglobulinas en el documento WO 92/16292, se realiza con concentraciones elevadas de sales liotrópicas, es decir, con una fuerza iónica de 2,25 o superior.

## Breve descripción de la invención

Se ha encontrado ahora sorprendentemente que varios tipos de sustancias aromáticas o heteroaromáticas enlazadas a una matriz en fase sólida, se pueden utilizar en un nuevo método para aislar y/o purificar inmunoglobulinas de diferentes tipos, procedentes de materias primas muy diferentes, con alta eficacia y con ventajas especiales en relación con el uso de pocas sales o ninguna, especialmente sales liotrópicas, en el procedimiento de unión y en relación con la capacidad para unirse a una amplia gama de inmunoglobulinas. Además, estas matrices tienen ventajas especiales con respecto a la estabilidad en NaOH, que tiene una importancia relevante cuando las matrices en fase sólida se tienen que regenerar después del uso.

Así, un objeto de la presente invención es proporcionar un método para el aislamiento de inmunoglobulinas procedentes de una solución que contiene una o varias inmunoglobulinas, que comprende las siguientes operaciones:

a) poner en contacto una solución que contiene una o varias inmunoglobulinas y que tiene un pH en el intervalo de 2,0 a 10,0, y un contenido total en sales correspondiente a una fuerza iónica de como máximo 2,0, con una matriz en fase sólida de fórmula general



en donde M designa el esqueleto de la matriz, SP1 designa un espaciador, y L designa un ligando que comprende un resto aromático o heteroaromático, opcionalmente sustituidos con un monociclo o un biciclo,

en donde el resto aromático o heteroaromático, o SP1 es portador de un grupo ácido, y en donde la concentración de ligando está en el intervalo de 10-120  $\mu\text{mol/ml}$  de matriz en fase sólida hidratada y sedimentada,

por lo que al menos una parte de las inmunoglobulinas queda unida a la matriz en fase sólida;

b) separar la matriz en fase sólida que tiene inmunoglobulinas unidas a la misma de la solución;

c) opcionalmente, lavar la matriz en fase sólida; y

d) poner en contacto la matriz en fase sólida con un eluyente para liberar una o varias inmunoglobulinas de la matriz en fase sólida;

con la condición de que se cumplan los criterios de (i) e (ii), o los criterios de (ii) e (iii):

(i) la matriz en fase sólida tiene una eficacia de la unión de por lo menos 50% cuando se somete a ensayo con un pH en el intervalo de 2,0 a 10,0 en el “*Ensayo convencional de la unión de inmunoglobulinas*” descrito en esta memoria; o

(ii) la matriz en fase sólida tiene una eficacia de la unión promedio de al menos 60%, para todas las inmunoglobulinas sometidas a ensayo en el “*Ensayo de la unión de anticuerpos monoclonales a una matriz*” cuando se somete a ensayo con un pH en el intervalo de 2,0 a 10,0; o

(iii) la estabilidad de la matriz en fase sólida en NaOH 1 M es de tal modo, que la incubación de la matriz en NaOH 1 M en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 7 días, reduce la eficacia de la unión, a un pH en el intervalo desde una unidad menos de pH que el valor de pH máximo en la unión, hasta una unidad más de pH que el valor de pH máximo en la unión, tal y como se determina en el “*Ensayo convencional de la unión de inmunoglobulinas*”, descrito en esta memoria, en menos del 25%, comparada con una matriz sin tratar correspondiente; y

con la segunda condición de que el peso molecular del ligando - L sea como máximo 500 Dalton.

Además se ha observado que las matrices mencionadas anteriormente, en donde el resto aromático o heteroaromático es portador de un grupo ácido, opcionalmente mediante un espaciador SP2, son igualmente idóneas para el aislamiento y la purificación de proteínas, sin la necesidad de añadir sales liotrópicas a la solución que contiene las proteínas (la materia prima) y sin la necesidad de emplear grandes cantidades de disolventes orgánicos para eluir las proteínas unidas de la matriz.

**Descripción detallada de la invención***Aislamiento de inmunoglobulinas*

5 En general, el método para aislar inmunoglobulinas se puede dividir en distintas etapas:

(a) *Equilibrar la matriz en fase sólida*

(b) *Poner en contacto la fase sólida con la solución de inmunoglobulinas*

10

(c) *Lavar la fase sólida*

(d) *Separar la fase sólida de la solución*

15

(d) *Eluir la inmunoglobulina unida*

(e) *Regenerar la matriz en fase sólida*

20 Sin embargo, puede depender de la aplicación específica si se realizan todas las etapas cada vez o no. Así, las únicas etapas obligatorias son las etapas de *puesta en contacto*, *separación* y *elución*, mientras que las etapas de *equilibrio*, *lavado* y *regeneración* se pueden realizar o no, según los requisitos específicos pertinentes para la aplicación real. El tipo de etapa de *separación* depende de las disposiciones reales (véase más abajo).

*Equilibrio*

25

Antes de poner en contacto la matriz en fase sólida con la solución que contiene la inmunoglobulina, se prefiere asegurar que la matriz y la solución están en un estado que da como resultado la unión deseada de la inmunoglobulina. Para ello, puede ser necesario por lo tanto, ajustar parámetros tales como el pH, la fuerza iónica y la temperatura y en algunos casos, añadir sustancias de otro tipo para favorecer la unión de las inmunoglobulinas y/o evitar la unión de impurezas.

30

Así, una etapa opcional es equilibrar la matriz en fase sólida, lavándola con una solución (p. ej., un tampón para ajustar el pH, la fuerza iónica, etc., o para introducir un detergente) proporcionando las características necesarias a la fase sólida.

35

*Puesta en contacto*

40 Cuando la matriz en fase sólida está en forma de partículas con forma esférica o irregular, la puesta en contacto de una solución que contiene una o varias inmunoglobulinas, se puede realizar en una columna del lecho fijo o en una columna de lecho fluidizado/expandido, que contiene la matriz en fase sólida. También se puede realizar con una simple operación por tandas, en donde la matriz en fase sólida se mezcla con la solución durante un tiempo determinado para permitir la unión de la(s) inmunoglobulina(s).

45 Siempre que la matriz en fase sólida está en forma de membranas u hojas permeables o semipermeables, la puesta en contacto se realiza generalmente bombeando/forzando la solución que contiene la inmunoglobulina, a través de la superficie y/o a través de una estructura porosa de la membrana o de la hoja, para asegurar que las inmunoglobulinas se pongan en contacto estrecho con los ligandos inmovilizados sobre la superficie y/o en las estructuras porosas.

50 Otras recomendaciones para este procedimiento se proporcionan en las “Herramientas para la purificación de anticuerpos monoclonales”, Gagnon, P., Validated Biosystems, 1996).

*Lavado*

55 Después de poner en contacto la matriz en fase sólida con la solución que contiene la inmunoglobulina, se realiza opcionalmente un proceso de lavado para eliminar las sustancias no unidas o unidas débilmente, tales como otras proteínas, lípidos, ácidos nucleicos u otras impurezas de la matriz. Sin embargo, en algunos casos en los que no es decisiva una alta pureza de la inmunoglobulina, se puede omitir el proceso de lavado, ahorrando una etapa del procedimiento así como la solución de lavado.

60 En otros casos en los que es necesaria una alta pureza de la inmunoglobulina, se pueden emplear diversos procedimientos de lavado diferentes, con tampones de lavado diferentes, antes de comenzar la elución.

65 Los tampones de lavado empleados dependerán de la naturaleza del adsorbente cromatográfico y del ligando que se une a las inmunoglobulinas. El tampón de lavado no debe perturbar la unión de la inmunoglobulina con el adsorbente, es decir, el pH, la concentración salina y otros aditivos deben estar ajustados de modo que solamente se eliminen las impurezas indeseadas, por la simple sustitución de la solución que contiene las impurezas que está presente en el adsorbente y alrededor del mismo, por el tampón de lavado - o en combinación con el mismo, eliminar también las impurezas unidas al adsorbente. La eliminación de las impurezas unidas a la matriz se puede realizar cambiando

el pH y/o la fuerza iónica o añadiendo una sustancia al tampón de lavado que interacciona competitivamente con el adsorbente o la impureza, desplazando de este modo la impureza del adsorbente.

El lavado (operación (c) en el método según la invención) se realiza preferentemente para separar los restos de la solución que contiene las inmunoglobulinas, y para separar otro tipo de biomoléculas.

### *Elución*

La elución de la inmunoglobulina unida se realiza generalmente poniendo en contacto la matriz en fase sólida que comprende la inmunoglobulina unida, con una solución que libera la inmunoglobulina del ligando sobre la matriz. La inmunoglobulina se libera de este modo en la solución y se puede sacar fuera de la matriz por lavado. La solución empleada para liberar la inmunoglobulina, debe tener generalmente características diferentes de las que se utilizan para ligar la inmunoglobulina p. ej., la solución puede tener un pH diferente, una fuerza iónica diferente, una temperatura diferente y/o puede comprender disolventes orgánicos (preferentemente sólo pequeñas cantidades), detergentes, agentes caotrópicos u otros reactivos desnaturalizantes. Las combinaciones de cambios en estos parámetros diferentes, también se emplean en general.

La elución también se puede realizar aplicando una solución que cambia gradualmente las condiciones desde unión a falta de unión, un procedimiento que típicamente se denomina elución en gradiente.

Una vez que la inmunoglobulina se ha liberado de la matriz en fase sólida, a la solución que está eluyendo, se puede recuperar a partir de la misma mediante medios opcionales, conocidos por sí mismos. En el caso más simple, la inmunoglobulina se puede utilizar directamente sin ningún cambio, pero en muchos casos se preferiría un cierto tipo de procedimiento de concentración, p. ej., la ultra-filtración, la liofilización o la precipitación (p. ej., la precipitación por sales). Además, la solución de la inmunoglobulina se puede purificar también muy bien, con otra etapa de procesamiento de carácter opcional.

### *Regeneración*

La matriz en fase sólida se puede limpiar opcionalmente, es decir, regenerar después de la elución de la inmunoglobulina. Este procedimiento se realiza típicamente de forma regular para minimizar la acumulación de impurezas que ensucian la superficie de la fase sólida, y/o para esterilizar la matriz para evitar la contaminación del producto con microorganismos que proliferan y se escapan de la fase sólida y del equipo utilizado, durante el procedimiento. Los modos populares para realizar dicha etapa de regeneración, son lavar la matriz en fase sólida con soluciones capaces de limpiar la matriz y/o de destruir los microorganismos. Las soluciones típicas para estos fines serían, p. ej., hidróxido sódico 0,1-1,0 M; soluciones de perácidos o de peróxido de hidrógeno; agentes desnaturalizantes, tales como el clorhidrato de guanidinio; soluciones que comprenden cloro activo, tales como soluciones de hipoclorito, disolventes orgánicos, tales como etanol; detergentes, etc. Un método especialmente preferido para este fin, es emplear hidróxido sódico 0,1-1,0 M, debido a la eficacia muy alta, al bajo coste, a la facilidad de neutralización con ácido clorhídrico y a la falta de problemas de residuos.

En una realización preferida de la presente invención, el método incluye: (i) equilibrar (etapa opcional), (ii) poner en contacto, (iii) lavar (etapa opcional), (iv) separar, (v) eluir, y (vi) regenerar, en donde el ciclo de las etapas (i) - (v) se repite una o varias veces, antes de la regeneración, y en donde la matriz en fase sólida se utiliza de nuevo después de la regeneración.

Las condiciones empleadas para las etapas de unión, lavado y elución pueden ser muy decisivas para la eficacia de la unión resultante, el rendimiento y la pureza de la inmunoglobulina. Diferentes matrices en fase sólida de acuerdo con la invención, pueden necesitar diferentes condiciones de unión, de lavado y de elución, para asegurar un resultado óptimo. Asimismo, la naturaleza de la materia prima tendrá un impacto muy significativo sobre las condiciones elegidas para ese procedimiento de aislamiento concreto, p. ej., soluciones muy diluidas de anticuerpos monoclonales en el material sobrenadante del cultivo de células de hibridoma (típicamente 10-100 µg/ml) se comportan de forma diferente que el mismo tipo de anticuerpos presentes en soluciones más concentradas, tales como fluidos ascíticos (1-5 mg/ml) e inmunoglobulinas presentes, p. ej., en el suero (1-2 mg/ml), requieren unas condiciones distintas de las de las inmunoglobulinas del plasma/suero (5-20 mg/ml), etc.

También la composición, es decir, el contenido en diferentes tipos de impurezas, puede variar significativamente entre diferentes materias primas, p. ej., la yema de huevo tiene una composición muy diferente comparada con el material sobrenadante del cultivo de células de hibridoma.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, generalmente es posible añadir diferentes sustancias a la solución que contiene la inmunoglobulina, para mejorar la unión de los anticuerpos a la matriz en fase sólida.

En una realización particular, la presente invención se refiere a métodos para aislar inmunoglobulinas y a matrices en fase sólida, consiguiendo de este modo una inmunoglobulina aislada con una pureza de por lo menos 10%, tal como por lo menos 30%, preferentemente por lo menos 50%, tal como por lo menos 70%, más preferentemente por lo menos 80%, tal como 90%, particularmente por lo menos 99%.

## ES 2 332 893 T3

Tal y como se ha mencionado anteriormente, se cree que el valor de pH para una eficacia máxima de la unión, para las matrices en fase sólida está en el intervalo de 2,0 a 10,0, muy probablemente en el intervalo de 3,0 a 9,0. Por tanto, es muy importante realizar el proceso de aislamiento, a un valor próximo a ese máximo (que por supuesto puede variar para diferentes combinaciones de inmunoglobulinas/matrices en fase sólida). Así, el pH de la solución que contiene las inmunoglobulinas (o las proteínas en general) está preferentemente en el intervalo de 2,0 a 10, tal como en el intervalo de 3,0 a 9,0. Sin embargo, dependiendo del tipo del ligando y del esqueleto de la matriz, el intervalo de pH es preferentemente 3,0 a 7,0 o 6,0 a 9,0.

Se cree que, cuando el ligando es del tipo -X-A-SP2-ACID, entonces el pH de la solución que contiene las inmunoglobulinas debe estar en el intervalo de 2,0 a 6,0, preferentemente en el intervalo de 2,5 a 5,5, tal como en el intervalo de 3,0 a 5,5, o en el intervalo de 4,0 a 5,5, que se corresponde con un valor máximo esperado de la eficacia de la unión para ese tipo específico de matriz.

En relación con la operación de puesta en contacto (i) anterior, se ha observado que no es necesario añadir cantidades excesivas de sal liotrópica para que las inmunoglobulinas se unan a la matriz. Así, el contenido total en sales, que incluyen, p. ej., NaCl, de la solución que contiene las inmunoglobulinas, sólo tiene que ser de un modo tal, que se corresponda con una fuerza iónica de como máximo 2,0, preferentemente en el intervalo de 0,05 a 2,0, tal como 0,05 a 1,4, especialmente en el intervalo de 0,05 a 1,0. Como requisito alternativo, la concentración de sales liotrópicas como tal debe ser lo más baja posible, de este modo, se ha mostrado que es posible operar con una solución que contiene inmunoglobulinas en la que la concentración de sales liotrópicas es como máximo 0,1 M, preferentemente como máximo 0,3 M, particularmente como máximo 0,2 M, tal como máximo 0,1 M.

Ejemplos de sales liotrópicas se proporcionan en "Herramientas para la purificación de anticuerpos monoclonales", Gagnon, P., Validated Biosystems, 1996), en donde se presenta la serie de Hofmeister de iones liotrópicos.

En relación con la concentración de inmunoglobulinas en la solución, se cree que las matrices en fase sólida pueden actuar en un intervalo de concentración muy amplio, por tanto, se cree que las matrices en fase sólida actúan de una forma igualmente eficaz con una concentración de inmunoglobulinas en solución, que contiene las inmunoglobulinas en el intervalo de 0,001 a 0,2 mg/ml, preferentemente 0,01 a 0,1 mg/ml, tal como en el material sobrenadante de cultivos de células de hibridoma, en el intervalo de 0,2 a 2,0 mg/ml, tal como en la leche y el lactosuero, en el intervalo de 5,0 a 20 mg/ml, tal como para diferentes sueros y plasmas animales, e incluso en el intervalo de 20-80 mg/ml, tal como en el calostro.

Se ha observado que la presente invención es especialmente adecuada para soluciones comprendidas en el intervalo de 0,1 a 30 mg de inmunoglobulinas por gramo de matriz en fase sólida, tal como en el intervalo de 0,2 a 2, o en el intervalo de 5,0 a 25 mg por gramo de matriz en fase sólida.

Así, la solución que contiene las inmunoglobulinas puede ser tanto una solución artificial como una solución biológica de inmunoglobulinas, tales como caldos de fermentación brutos; cultivos de células de mamíferos, tales como cultivos de células de hibridoma; caldos de fermentación procedentes de cultivos de microorganismos modificados genéticamente, tales como *E. coli*; fluidos ascíticos, tales como fluido ascítico de ratón y de rata; leche, lactosuero, sangre, plasma y suero humano, de ratón, de rata, de vaca, de cerdo, de conejo, de cabra, de cobaya y de burro; y yema de huevo, tal como la yema de huevo de pollo.

Además, se ha observado (véanse los ejemplos) que se pueden obtener ventajas especiales en relación con la pureza, cuando la solución que contiene las inmunoglobulinas comprende un detergente cargado negativamente. Sin estar vinculado a ninguna teoría, se cree que el detergente evita la adherencia de otras biomoléculas a la matriz. Ejemplos de tales detergentes son el sulfato de octilo, el azul de bromofenol, el sulfonato de octano, el laurilsarcosinato de sodio y el sulfonato de hexano.

También, en la etapa de lavado (operación (iii) del método según la invención) es ventajoso, probablemente por las mismas razones, el uso de un detergente cargado negativamente. El detergente se puede utilizar aislado o junto con un tampón, p. ej., un tampón de sales liotrópicas. El uso de sales liotrópicas en la etapa de lavado (volumen pequeño), representa solamente un pequeño problema con el producto residual, comparado con el uso de sales liotrópicas en los procedimientos de unión (operación (i)) (ya que el procedimiento de unión incluye el uso de grandes volúmenes en la mayoría de los casos).

También, las propiedades excelentes de las matrices en fase sólida para el uso en el método según la invención, se puede expresar incluso sin el uso de disolventes orgánicos en la etapa del elución (operación (d)), así, preferentemente, el eluyente utilizado comprende menos de 10% (v/v) de disolventes orgánicos, preferentemente menos de 5%. Más preferentemente, no se emplean disolventes orgánicos en absoluto.

Alternativamente, tal y como se muestra en el ejemplo 14, se puede utilizar una cantidad mayor de disolventes no tóxicos, p. ej., propilenglicol, p. ej., propilenglicol hasta 40%.

La etapa de puesta en contacto (operación (a)) así como la etapa siguiente, es decir, la separación, el lavado y la elución, se pueden realizar de modos diferentes. Las medidas físicas seleccionadas se guían a menudo por la escala y por si hay que repetir el procedimiento. Las matrices en fase sólida según la invención, se pueden utilizar en casi

cualquiera de las disposiciones utilizadas para el desarrollo y para fines industriales. Así, la matriz en fase sólida se puede poner en contacto con la solución que contiene las inmunoglobulinas, p. ej., en un procedimiento de agitación por tandas, en un procedimiento de columna cromatográfica con lecho fijo y en un procedimiento con lecho fluidizado. Otras recomendaciones se proporcionan en las "Herramientas para la purificación de anticuerpos monoclonales", Gagnon, P., Validated Biosystems, 1996).

Otras medidas necesarias para realizar el aislamiento de inmunoglobulinas según la invención, siguen metodologías convencionales.

La presente invención proporciona un método para el aislamiento y la purificación de inmunoglobulinas a partir de una amplia variedad de materias primas que tienen diferentes concentraciones de inmunoglobulinas, típicamente en el intervalo desde aproximadamente 10  $\mu\text{g/ml}$  en el material sobrenadante del cultivo de células de hibridoma y aproximadamente desde 1-2 mg/ml en leche y lactosuero hasta aproximadamente 5-20 mg/ml en diferentes sueros/plasmas de animales, y hasta 50-60 mg/ml en el calostro. La naturaleza y la concentración relativa de diferentes impurezas que interfieren potencialmente con la unión y el aislamiento de las inmunoglobulinas, también varían en un grado muy elevado entre las diferentes fuentes de inmunoglobulina.

Para algunas aplicaciones de inmunoglobulinas, tiene mucha importancia que las inmunoglobulinas sean extremadamente puras, p. ej., que tengan una pureza superior al 99%. Esto es particularmente válido, siempre que la inmunoglobulina se vaya a utilizar como agente terapéutico, pero también es necesario para otras aplicaciones. En el campo del diagnóstico, el grado de pureza necesario puede depender de un número de factores, tales como si el anticuerpo se va a utilizar sin derivatizar, en cuyo caso no será necesario un alto grado de pureza, es decir, menos del 50%, o si el anticuerpo se tiene que marcar con una molécula señalizadora, tal como una enzima, p. ej., peroxidasa de rábano picante, en cuyo caso el anticuerpo requiere frecuentemente tener una pureza de al menos 80% o superior. Para otras aplicaciones, la necesidad de pureza puede diferir de forma correspondiente. Sin embargo, parece que es una demanda general que la pureza de la inmunoglobulina sea al menos del 10% sobre una base de materia seca, para posibilitar un uso apropiado del producto. Sin embargo, la presente invención proporciona, como debe estar claro, unas recomendaciones para resolver estos problemas.

### 30 *Matrices en fase sólida*

Tal y como se ha descrito anteriormente, el método según la invención incluye el uso de una matriz en fase sólida, en donde la matriz en fase sólida comprende un esqueleto funcionalizado de la matriz que es portador de una pluralidad de grupos funcionales con la fórmula siguiente



en donde M designa el esqueleto de la matriz, SP1 designa un espaciador y L designa un ligando que comprende un resto aromático o heteroaromático opcionalmente sustituido con un monociclo o biciclo, con la condición de que el peso molecular del ligando-L sea como máximo 500 Dalton, en donde el resto aromático o heteroaromático de SP1 es portador de un grupo ácido, y en donde la concentración de ligando está en el intervalo de 10-120  $\mu\text{mol/ml}$  de matriz en fase sólida sedimentada e hidratada, el cual tiene que satisfacer determinados criterios.

La matriz en fase sólida puede comprender, como el esqueleto de la matriz, cualquier material orgánico o inorgánico, natural o sintético, conocido por ser aplicable en la separación en fase sólida, de proteínas y de otras biomoléculas, p. ej., polisacáridos naturales o sintéticos, tales como agar-agar y agarosas; celulosas, éteres de celulosa, tales como hidroxipropil celulosa, carboximetil celulosa; almidones; gomas, tales como la goma guar y la goma arábiga, goma ghatti, goma de tragacanto, goma de algarrobbilla, goma de xantano; pectinas; mucinas; dextranos; quitinas; quitosanos; alginatos; carragenanos; heparinas; gelatinas; polímeros sintéticos, tales como poliamidas, tales como poliacrilamidas y polimetacrilamidas; poliimidas; poliésteres; poliéteres; compuestos vínflicos polímeros, tales como polivinilalcoholes y poliestirenos; polialquenos; materiales inorgánicos, tales como materiales de tipo silicio, tales como dióxido de silicio que incluye el sílice amorfo y el cuarzo; sílices; silicatos de metal, vidrios y cerámicas de poro controlado; óxidos metálicos y sulfuros, o combinaciones de estos materiales naturales o sintéticos y orgánicos o inorgánicos.

El esqueleto de la matriz se selecciona preferentemente a partir de agar-agar, agarosas, celulosas, éteres de celulosa, tales como hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, poliamidas, tales como poli(met)acrilamidas, polivinilalcoholes, sílices y vidrios con poro controlado.

Materiales en fase sólida especialmente interesantes como esqueletos de la matriz son, p. ej., las resinas de agar o de agarosa, tales como resinas de Sepharose y Superose de Pharmacia Biotech, Suecia y Biogel A de Biorad, EE.UU.; resinas a base de dextrano, tales como Sephadex, Pharmacia Biotech; resinas y membranas a base de celulosa, tales como celulosa de Perloza procedente de Secheza, Checoslovaquia; resinas de material compuesto, tales como Sephacryl y Superdex, Pharmacia Biotech; resinas de polímeros orgánicos sintéticos, tales como Fractogel de Toso-Haas, EE.UU.; medios POROS de Perceptive Biosystems, EE.UU., Bio-Rex, Biogel P y Macro Prep de Biorad, HEMA y Separon de TESSEK, y medios de Hyper D y Trisacryl de BioSeptra, EE.UU., Enzacryl y Azlactone de 3M, EE.UU.; resinas de materiales de tipo síliceo, tales como vidrio de poro controlado, PROSEP de Bioprocessing, Inglaterra y



Spherocil, BioSeptra; y materiales compuestos revestidos con sílice en forma de resinas o membranas, tales como ACTI-DISK, ACTI-MOD y CycloSep de Arbor Technologies, EE.UU.

Típicamente, el esqueleto de la matriz en fase sólida, así como la matriz en fase sólida funcionalizada resultante, pueden estar en forma de, p. ej., partículas irregulares o perlas esféricas, membranas o láminas, superficies moldeadas, o varillas. El material de la fase sólida puede ser además completamente permeable o parcialmente permeable, o totalmente impermeable a las proteínas. En una realización particularmente interesante de la presente invención, la matriz está en forma de perlas irregulares o esféricas, con tamaños en el intervalo de 1-10000  $\mu\text{m}$ , preferentemente 10-1000  $\mu\text{m}$ ; tal como 10-60  $\mu\text{m}$  para aplicaciones de alto rendimiento y tales como 50-500  $\mu\text{m}$ , preferentemente 50-300  $\mu\text{m}$ , para fines preparativos.

Una forma particularmente interesante de matriz, es una matriz con densidad controlada, en forma de conglomerado, que comprende partículas que controlan la densidad. Estos conglomerados, que son especialmente aplicables en operaciones a gran escala, para la cromatografía de lecho fluidizado o expandido, así como diferentes técnicas cromatográficas por lotes, en columnas no empaquetadas, p. ej., la adsorción de lotes aislados en depósitos con agitación, se describe en el documento WO 92/00799.

Los ligandos L se pueden fijar al material de la fase sólida, a través de cualquier tipo de enlace covalente conocido por sí mismo, para ser aplicables para este fin, mediante una reacción química directa entre el ligando y el material en fase sólida o por una activación anterior del material en fase sólida o del ligando, con un reactivo adecuado conocido por sí mismo, haciendo posible la conexión del esqueleto de la matriz con el ligando. Ejemplos de tales reactivos activadores adecuados son epíclorohidrina, epibromohidrina, éter glicídico de alilo; bis-epóxidos, tales como éter diglicídico de butanol; compuestos alifáticos sustituidos con halógeno, tales como di-cloro-propanol; carbonildiimidazol; aldehídos, tales como dialdehído glutárico; quinonas; bromuro de cianógeno; peryodatos, tales como sodio-meta-peryodato; carbodiimidazoles; cloro-triazinas, tales como cloruro de cianuro; cloruros de sulfonilo, tales como cloruros de tosilo y cloruros de tresilo; N-hidroxi-succinimidazoles; toluen-4-sulfonatos de 2-fluoro-1-metilpiridinio; oxazolonas; maleimidazoles; disulfuros de piridilo; e hidrazidas. Entre éstos, se prefieren los reactivos activadores que eliminan un grupo espaciador SP1 diferente de un enlace aislado, p. ej., epíclorohidrina, epibromohidrina, éter glicídico de alilo; bis-epóxidos; compuestos alifáticos sustituidos con halógeno; aldehídos; quinonas; bromuro de cianógeno; cloro-triazinas; oxazolonas; maleimidazoles; disulfuros de piridilo; e hidrazidas.

Reactivos activadores especialmente interesantes se cree que son compuestos epoxídicos, tales como epíclorohidrina, éter glicídico de alilo y éter diglicídico de butanol.

Las posibilidades mencionadas anteriormente vuelven pertinente definir la presencia de un espaciador opcional SP1 que se liga a la matriz M y al ligando L. En el presente contexto, el espaciador SP1 debe ser considerado como parte del reactivo activador que forma el enlace entre la matriz y el ligando. Así, el espaciador SP1 equivale a los reactivos activadores y a las reacciones de acoplamiento implicadas. En algunos casos, p. ej., cuando se emplean carbodiimidazoles, el reactivo activador forma una forma activada de la matriz o del reactivo del ligando. Después del acoplamiento, no se deja ninguna parte del reactivo activador entre el ligando y la matriz y, por tanto, SP1 es simplemente un enlace simple.

En otros casos, el espaciador SP1 es una parte integral del grupo funcional que efectúa las características de la unión, es decir, el ligando, y esto será especialmente significativo, si el espaciador SP1 comprende sitios o sustituyentes funcionalmente activos, tales como tioles, aminas, grupos ácidos, grupos sulfona, grupos nitro, grupos hidroxilo, grupos nitrilo u otros grupos capaces de interactuar a través de enlaces de hidrógeno, de enlaces electrostáticos o por repulsión, transferencia de la carga o similares.

En aún otros casos, el espaciador SP1 puede comprender un anillo aromático o heteroaromático que tiene un papel principal para las características de la unión de la matriz en fase sólida. Este podría ser, por ejemplo, el caso en el que se emplearan quinonas o clorotriazinas como agentes activadores para la matriz en fase sólida o el ligando.

Preferentemente, el espaciador SP1 es un enlace simple o un birradical, obtenido a partir de un reactivo activador seleccionado entre epíclorohidrina, éter glicídico de alilo, bis-epóxidos, tales como éter diglicídico de butanol, compuestos alifáticos sustituidos con halógeno, tales como 1,3-dicloropropan-2-ol, aldehídos, tales como dialdehído glutárico, quinonas, bromuro de cianógeno, cloro-triazinas, tales como cloruro de cianuro, toluen-4-sulfonatos de 2-fluoro-1-metilpiridinio, maleimidazoles, oxazolonas e hidrazidas.

Preferentemente, el espaciador SP1 se selecciona a partir de birradicales alifáticos de cadena corta, p. ej., de fórmula  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$  (obtenido a partir de epíclorohidrina),  $-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$  (obtenido a partir de éter glicídico de alilo) o  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$  (obtenido a partir de éter diglicídico de butanol; o un enlace simple.

Debido al riesgo de fuga de material (p. ej., el ligando y/o el espaciador) desde una matriz en fase sólida al producto eluido (p. ej., la inmunoglobulina) el peso molecular del ligando (o del ligando + el espaciador opcional) se escoge ventajosamente lo más bajo posible. Un inconveniente importante de usar la proteína A, la proteína G, los péptidos sintéticos y otros ligandos con peso molecular relativamente alto (p. ej., colorantes), es que puede ser difícil o incluso imposible separar cualquier ligando liberado (que incluye opcionalmente el espaciador) de la inmunoglobulina eluida,

debido a la poca diferencia entre los pesos moleculares respectivos y la tendencia natural de los componentes a unirse entre sí. Esto puede tener un efecto perjudicial en los casos en los que se emplea la inmunoglobulina como agente terapéutico, provocando un choque anafiláctico u otros síntomas graves en el paciente. Cuanto más pequeño sea el peso molecular del ligando (incluyendo su espaciador), se podrá separar con mayor eficacia cualquier ligando fugado, del producto de inmunoglobulina. Otra ventaja significativa de tener el peso molecular más pequeño posible del ligando (o del conjugado del brazo ligando-espaciador) es que cualquier material fugado, que no se haya podido separar de la inmunoglobulina antes de la inyección/ingestión en el paciente, mostrará una antigenicidad mínima, cuanto más bajo sea el peso molecular y, por lo tanto, en general será más aceptable para el organismo que los ligandos con peso molecular más elevado.

Por tanto, se prefiere que el ligando L tenga un peso molecular inferior a 500 Dalton, preferentemente inferior a 400 Dalton, más preferentemente inferior a 300 Dalton, tal como inferior a 250 Dalton, o aún inferior a 200 Dalton.

En relación con el conjugado del brazo ligando-espaciador conjugado (-SP1-L), se prefiere que el peso molecular sea inferior a 500 Dalton, más preferentemente inferior a 400 Dalton, tal como inferior a 300 Dalton, o aún inferior a 250 Dalton.

Según la invención, la matriz comprende ligandos que, solos o junto con un espaciador SP1 (e incluso el esqueleto de la matriz), hacen posible la unión de las inmunoglobulinas a la misma. Se ha observado que una parte crucial del ligando es un resto aromático o heteroaromático, monocíclico o bicíclico, que puede ser portador de unos o varios sustituyentes, siendo uno de los cuales preferentemente un sustituyente que comprende un resto ácido.

La expresión “monocíclico o bicíclico” significa que la parte central del resto en cuestión, consiste en un anillo o en dos anillos fusionados, p. ej., tal como benceno y naftaleno, respectivamente, y, por tanto, no en ligandos que comprenden dos anillos separados, tal como el bifenilo.

Se ha observado que la estructura de la parte aromática o heteroaromática del ligando, L, puede cubrir un amplio espectro de diferentes estructuras que tengan opcionalmente uno o varios sustituyentes sobre el(los) anillo(s) aromático o heteroaromático. Sin embargo, parece que es más decisivo qué sustituyentes están presentes, p. ej., en un anillo de benceno, a que el ligando se una de forma eficaz a la inmunoglobulina, que es el objeto de la presente invención, o si la unión es solamente moderada o baja.

Aunque los ligandos se denominan en esta memoria y a continuación, empleando la nomenclatura correspondiente al compuesto químico individual y diferenciado, a partir del cual se obtienen, se debe entender que el ligando real L es un radical de tal compuesto.

Sin embargo, basándose en nuestros hallazgos preliminares, se prefiere especialmente emplear matrices que comprenden grupos aromáticos o heteroaromáticos (radicales) de los tipos siguientes, como grupos funcionales: ácidos benzoicos, tales como ácidos 2-aminobenzoicos, ácidos 3-aminobenzoicos, ácidos 4-aminobenzoicos, ácidos 2-mercaptobenzoicos, ácido 4-amino-2-clorobenzoico, ácido 2-amino-5-clorobenzoico, ácido 2-amino-4-clorobenzoico, ácidos 4-aminosalicílicos, ácidos 5-aminosalicílicos, ácidos 3,4-diaminobenzoicos, ácido 3,5-diaminobenzoico, ácido 5-aminoisoftálico, ácido 4-aminoftálico; ácidos cinámicos, tales como ácidos hidroxí-cinnámicos; ácidos nicotínicos, tales como ácidos 2-mercaptónicotínicos; ácidos naftoicos, tales como ácido 2-hidroxí-1-naftoico; quinolinas, tales como 2-mercaptoquinolina; ácidos tetrazolacéticos, tales como ácido 5-mercapto-1-tetrazolacético; tiadiazoles, tales como 2-mercapto-5-metil-1,3,4-tiadiazol; bencimidazoles, tales como 2-amino-bencimidazol, 2-mercaptobencimidazol y 2-mercapto-5-nitrobencimidazol; benzotiazoles, tales como 2-aminobenzotiazol, 2-amino-6-nitrobenzotiazol, 2-mercaptobenzotiazol y 2-mercapto-6-etoxibenzotiazol; benzoxazoles, tales como 2-mercaptobenzoxazol; tiofenoles, tales como tiofenol y 2-aminotiofenol; ácido 2-(4-aminofeniltio)acético; ácidos sulfónicos y ácidos fosfónicos aromáticos o heteroaromáticos, tales como ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico y fenoles, tales como 2-amino-4-nitrofenol. Se debe tener en cuenta que en el caso en el que M es agarosa, SP1 se obtiene a partir de vinil sulfona, y L es ácido 4-aminobenzoico y se rechaza específicamente en relación con las matrices en fase sólida, según la invención, compárese con el documento WO 92/16292.

La estructura detallada del ligando parece determinar características funcionales importantes para el aislamiento de inmunoglobulinas procedentes de diferentes fuentes. Por tanto, diferentes ligandos que comprenden estructuras aromáticas estrechamente relacionadas o no, parece que dan como resultado cambios significativos en la fuerza de la unión, en la selectividad de la unión, en la capacidad de la unión y el rendimiento general de la inmunoglobulina, cuando se aplica en el aislamiento de anticuerpos procedentes de diferentes materias primas.

Para la unión de inmunoglobulinas a un pH cercano al neutro (aproximadamente pH 5 a pH 9) se prefiere emplear un ligando que comprenda radicales obtenidos a partir de un anillo de benceno fusionado con un sistema de anillos heteroaromáticos, p. ej., un ligando seleccionado entre bencimidazoles, tales como 2-mercapto-bencimidazol y 2-mercapto-5-nitro-bencimidazol; benzotiazoles, tales como 2-amino-6-nitrobenzotiazol, 2-mercaptobenzotiazol y 2-mercapto-6-etoxibenzotiazol; benzoxazoles, tales como 2-mercaptobenzoxazol. Sin pertenecer al grupo anterior de ligandos, pero también preferido para la unión de inmunoglobulinas a un pH cercano al neutro, se eligen ligandos entre el grupo de tiofenoles, tales como tiofenol y 2-aminotiofenol.

## ES 2 332 893 T3

Por tanto, tal y como queda claro por lo mencionado anteriormente y por los resultados mostrados en esta memoria, el ligando L se selecciona preferentemente a partir de radicales que tienen la fórmula siguiente



en donde X designa -O-, -S- o -NH-, A designa un anillo o un sistema de anillos aromáticos o heteroaromáticos, y SUB designa unos o varios sustituyentes.

Se entiende que X es una parte integral del ligando porque el compuesto aromático o heteroaromático que forma la parte del ligando de la matriz en fase sólida, después de reaccionar con un esqueleto activado de la matriz, debe incluir un grupo hidroxilo (X es -O-), un grupo mercapto (X es -S-) o un grupo amino (X es -NH-) fijado directamente al resto aromático o heteroaromático. Ejemplos de tales compuestos son ácido 3-hidroxi-cinnámico, ácido 2-mercapto-benzoico y ácido 2-amino-benzoico. Se debe entender que si el compuesto aromático o heteroaromático comprende, p. ej., un grupo hidroxilo, así como un grupo amino, la matriz en fase sólida resultante puede comprender una mezcla del ligando fijada al enlazador a través del grupo amino y a través del grupo hidroxilo, respectivamente.

Los radicales aromáticos se seleccionan preferentemente a partir de radicales de benceno y de radicales de naftaleno.

El radical aromático es preferentemente un radical benceno, tal como fenilo, 1,2-fenileno, 1,3-fenileno, 1,4-fenileno, 1,2,3-benzotriilo, 1,2,4-benzotriilo, 1,3,5-benzotriilo, 1,2,3,4-benzotetrailo, 1,2,3,5-benzotetrailo, 1,2,4,5-benzotetrailo y 1,2,3,4,5-benzopentailo.

Los radicales heteroaromáticos se seleccionan preferentemente a partir de radicales monocíclicos heteroaromáticos, tales como tiofeno, furano, pirano, pirrol, imidazol, pirazol, isotiazol, isoxazol, piridina, pirazina, pirimidina y radicales de piridazina; y de radicales bicíclicos heteroaromáticos, tales como indol, purina, quinolina, benzofurano, bencimidazol, benzotiazol y radicales de benzoxazol.

El radical heteroaromático se puede seleccionar a partir de radicales de piridina, bencimidazol, benzotiazol y benzoxazol.

Un grupo preferido de ligandos para material aislado a partir de inmunoglobulina de alta pureza, se elige entre ácidos amino-benzoicos, tales como ácido 2-amino-benzoico, ácido 2-mercapto-benzoico, ácido 3-amino-benzoico, ácido 4-amino-benzoico, ácido 4-amino-2-clorobenzoico, ácido 2-amino-5-clorobenzoico, ácido 2-amino-4-clorobenzoico, ácidos 4-aminosalicílicos, ácidos 5-aminosalicílicos, ácidos 3,4-diaminobenzoicos, ácido 3,5-diaminobenzoico, ácido 5-aminoisoftálico, ácido 4-aminoftálico.

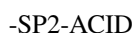
Otro grupo preferido de ligandos que proporciona un alto grado de pureza en la inmunoglobulina aislada, es el grupo de ácidos cinámicos, tales como ácidos 2-hidroxi-cinnámico, o ácido 3-hidroxi-cinnámico y ácido 4-hidroxi-cinnámico.

Todavía otro grupo preferido de ligandos para el aislamiento de inmunoglobulinas de alta pureza, se obtiene a partir del grupo de compuestos heteroaromáticos que comprenden un ácido carboxílico y un grupo amino como sustituyentes, tales como ácido 2-amino-nicotínico, ácido 2-mercapto-nicotínico, ácido 6-amino-nicotínico y ácido 2-amino-4-hidroxipirimidin-carboxílico.

Los esqueletos y los espaciadores de la matriz de agarosa obtenidos a partir de compuestos epoxídicos, son especialmente importantes junto con estos grupos preferidos de ligandos.

En relación con los sustituyentes en el resto aromático o heteroaromático, el SUB comprende preferentemente por lo menos un grupo ácido.

En una realización de la presente invención particularmente interesante, el SUB comprende por lo menos un sustituyente con la siguiente fórmula



en donde SP2 designa un segundo espaciador opcional y ACID designa un grupo ácido.

En el contexto presente, la expresión "grupo ácido" significa grupos que tienen un valor de pKa inferior a aproximadamente 6,0, tales como un grupo de ácido carboxílico (-COOH), un grupo de ácido sulfónico (-SO<sub>2</sub>OH), un grupo de ácido sulfínico (-S(O)OH), un grupo de ácido fosfínico (-PH(O)(OH)), grupos monoésteres de ácido fosfónico (-P(O)(OH)(OR)), y grupos de ácido fosfónico (-P(O)(OH)<sub>2</sub>). El valor del pKa del grupo ácido debe estar preferentemente en el intervalo de 1,0 a 6,0.

El grupo ácido se selecciona preferentemente a partir de ácido carboxílico, ácido sulfónico y ácido fosfónico.

El grupo SP2 se selecciona a partir de alquilenilo-C<sub>1-6</sub> y de alquilenilo-C<sub>2-6</sub>, o SP2 designa un enlace simple. Ejemplos de birradicales relevantes son metileno, etileno, propileno, propenileno, isopropileno y ciclohexileno. Preferentemente, SP2 designa metileno, etenileno, o un enlace simple.

- 5 En una realización de la presente invención, SUB designa un grupo -SP2-ACID. En este caso, SP2 es preferentemente un enlace simple.

El SUB, sin embargo, puede designar un sustituyente -SP2-ACID, así como uno o varios sustituyentes adicionales, seleccionados independientemente a partir de hidroxilo, amino, ciano, mono- y di(alquil-C<sub>1-6</sub>)amino y de halógeno, tal como yodo, bromo, cloro y flúor, sulfanilo, nitro, alquil-C<sub>1-6</sub>carboxi, y aminocarboxi, mono- y di(alquil-C<sub>1-6</sub>)aminocarboxi, carboxi, sulfono, sulfonamida, éster fosfónico con alquilo-C<sub>1-6</sub>, alquilo-C<sub>1-12</sub> opcionalmente sustituido, alquilenilo-C<sub>2-12</sub> opcionalmente sustituido, alquiniilo-C<sub>1-12</sub> opcionalmente sustituido y alcoxi-C<sub>1-12</sub> opcionalmente sustituido, tioéster, o el sustituyente es un átomo de oxígeno que junto con dos valencias de un átomo de carbono del resto aromático o heteroaromático, forma un grupo oxo. Además, SUB puede designar otro grupo -SP2-ACID, tal y como se ha definido anteriormente. Se debe tener en cuenta que los sustituyentes definidos para SUB, se corresponden con los sustituyentes opcionales para L.

En otra realización preferida, SUB designa un sustituyente -P2-ACID así como uno o varios sustituyentes adicionales, seleccionados independientemente entre hidroxilo, amino, ciano, halógeno, sulfanilo, nitro, alquil-C<sub>1-6</sub>-metilo opcionalmente sustituido, etilo, propilo, butilo, isobutilo y ciclohexilo, alquilenilo-C<sub>2-6</sub> opcionalmente sustituido, alquiniilo-C<sub>2-6</sub> opcionalmente sustituido, alcoxi-C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido, carboxi y sulfono, o el sustituyente es un átomo de oxígeno que junto con dos valencias de un átomo de carbono del resto aromático o heteroaromático, forma un grupo oxo. También en este caso, SP2 designa preferentemente metileno, etenileno o un enlace simple, preferentemente un enlace simple.

En el contexto presente, la expresión “alquilo-C<sub>1-12</sub>” significa grupos alquilo con 1-12 átomos de carbono que pueden ser lineales o ramificados o cíclicos, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, octilo, dodecilo, ciclopentilo, ciclohexilo, decalinilo, etc.

La expresión “alquilo-C<sub>1-12</sub> opcionalmente sustituido” significa un grupo alquilo-C<sub>1-12</sub> que puede estar sustituido con uno o varios grupos, preferentemente 1-3 grupos, seleccionados entre carboxi; carboxi protegido, tal como un carboxi éster, p. ej., alcoxi-C<sub>1-6</sub>-carbonilo; aminocarbonilo; mono- y di(alquil-C<sub>1-6</sub>)-aminocarbonilo; amino-alquil-C<sub>1-6</sub>-aminocarbonilo; mono- y di(alquil-C<sub>1-6</sub>)amino-alquil-C<sub>1-6</sub>-aminocarbonilo; amino; mono- y di(alquil-C<sub>1-6</sub>)amino; alquil-C<sub>1-6</sub>-carbonilamino; hidroxilo; hidroxilo protegido, tal como aciloxi, p. ej., alcanoil-C<sub>1-6</sub>-oxi; sulfono; alquil-C<sub>1-6</sub>-sulfonilo; nitro; fenilo; fenil-alquilo-C<sub>1-6</sub>; halógeno; nitrilo; y mercapto.

Ejemplos de grupos alquilo-C<sub>1-12</sub> sustituidos son carboxi-alquilo-C<sub>1-12</sub> (p. ej., carboximetilo y carboxietilo), carboxi-alquilo-C<sub>1-12</sub> protegido, tal como carboxi-alquilo-C<sub>1-6</sub> esterificado (p. ej., alcoxi-C<sub>1-6</sub>-carbonil-alquilo-C<sub>1-12</sub>, tal como metoxicarbonilmetilo, etoxicarbonilmetilo y metoxicarboniletilo), aminocarbonil-alquilo-C<sub>1-12</sub> (p. ej., aminocarboniletilo, aminocarbonilmetilo y aminocarbonilpropilo), alquil-C<sub>1-6</sub>-aminocarbonil-alquilo-C<sub>1-12</sub> (p. ej., metilaminocarbonilmetilo y etilaminocarbonilmetilo), amino-alquil-C<sub>1-6</sub>-aminocarbonil-alquilo-C<sub>1-12</sub> (p. ej., aminometilaminocarbonilmetilo y aminoetilaminocarbonilmetilo), mono- o di(alquil-C<sub>1-6</sub>)amino-alquil-C<sub>1-6</sub>-aminocarbonil-alquilo-C<sub>1-12</sub> (p. ej., dimetilaminometilaminocarbonilmetilo y dimetilaminoetilaminocarbonilmetilo), mono- o di(alquil-C<sub>1-6</sub>)amino-alquilo-C<sub>1-12</sub> (p. ej., dimetilaminometilo y dimetilaminoetilo), hidroxilo-alquilo-C<sub>1-12</sub> (p. ej., hidroximetilo e hidroxietilo), hidroxilo-alquilo-C<sub>1-12</sub> protegido, tal como aciloxi-alquilo-C<sub>1-12</sub> (p. ej., alcanoil-C<sub>1-6</sub>-oxi-alquilo-C<sub>1-12</sub>, tal como acetiloxietilo, acetiloxipropilo, acetiloxibutilo, acetiloxipentilo, propioniloxi-metilo, butiriloximetilo y hexanoiloximetilo).

En el contexto presente, la expresión “alquilenilo-C<sub>2-12</sub>” significa grupos alquilo mono-, di- o poliinsaturados, con 2-12 átomos de carbono que pueden ser lineales o ramificados o cíclicos, en los que el(los) doble(s) enlace(s) puede(n) estar presente(s) en cualquier lugar en la cadena o en el(los) anillo(s), por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, 2-propenilo, hexenilo, decenilo, 1,3-heptadienilo, ciclohexenilo, etc. Algunos de los sustituyentes se muestran con ambas configuraciones, cis y trans. El alcance de esta invención comprende las formas cis y trans.

En el contexto presente, la expresión “alquiniilo-C<sub>2-12</sub>” significa un grupo alquilo lineal o ramificado con 2-12 átomos de carbono y que incorpora uno o varios triples enlaces, p. ej., etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 2-butinilo, 1,6-heptadiinilo, etc.

En las expresiones “alquilenilo-C<sub>2-12</sub> opcionalmente sustituido” y “alquiniilo-C<sub>2-12</sub> opcionalmente sustituido”, el término “opcionalmente sustituido” significa que el resto se puede sustituir una o varias veces, preferentemente 1-3 veces, con uno de los grupos definidos anteriormente para “alquilo-C<sub>1-12</sub> opcionalmente sustituido”.

El término “alquil-C<sub>1-12</sub>-oxi opcionalmente sustituido” designa, como en la nomenclatura química tradicional, un grupo alquil-C<sub>1-12</sub>-oxi opcionalmente sustituido, que se puede sustituir una o varias veces, preferentemente 1-3 veces, con los sustituyentes indicados para “alquilo opcionalmente sustituido”, descrito anteriormente.

Las expresiones “alquilo-C<sub>1-6</sub>”, “alquilenilo-C<sub>2-6</sub>”, “alquiniilo-C<sub>2-6</sub>” y “alcoxi-C<sub>1-6</sub>” reflejan los análogos más cortos de los grupos “alquilo-C<sub>1-12</sub>”, “alquilenilo-C<sub>2-12</sub>”, “alquiniilo-C<sub>2-12</sub>” y “alcoxi-C<sub>1-12</sub>”.

## ES 2 332 893 T3

Las expresiones “alquilenilo-C<sub>1-6</sub>” y “alquenilenilo-C<sub>2-6</sub>” significan los birradicales de los grupos definidos para “alquilo-C<sub>1-6</sub>” y “alquenilo-C<sub>2-6</sub>”, respectivamente.

La presente invención no debe ligarse a ninguna teoría específica, sin embargo, se prevé que la configuración electrónica especial del resto aromático o heteroaromático, junto con unos o varios heteroátomos, que pueden estar localizados en el sistema de anillos heteroaromáticos o como un sustituyente sobre el anillo, esté implicada en la unión específica de inmunoglobulinas, así como en la unión de otras proteínas.

Por tanto, en una realización interesante de la presente invención, el ligando comprende por lo menos un átomo de nitrógeno, de azufre o de fósforo, p. ej., como un átomo en el anillo o como un sustituyente en el anillo aromático (heteroaromático), tal como un grupo amino o nitro, o un grupo de ácido sulfónico o un grupo de ácido fosfónico.

Una combinación especialmente interesante de sustituyentes, parece ser cualquier combinación de al menos un grupo amino o un grupo mercapto, con al menos un grupo ácido, seleccionado entre los ácidos carboxílicos, los ácidos sulfónicos, y los ácidos fosfónicos.

Se prevé que una combinación de dos o varios de los tipos de ligandos definidos en esta memoria, sobre el mismo esqueleto de la matriz, pueden conducir a determinadas ventajas, en relación con una alta eficacia de la unión y/o una pureza elevada de la inmunoglobulina. Sin embargo, en una realización importante de la presente invención, todos los grupos funcionales sobre la matriz en fase sólida, son sustancialmente idénticos.

Para mejorar la eficacia de la unión y la pureza del producto también se ha observado el acoplamiento del ligando a una matriz que ya comprende restos cargados negativa o positivamente, tales como grupos amino cargados positivamente o grupos de ácido carboxílico, ácido sulfónico o ácido fosfónico cargados negativamente.

La concentración del ligando puede tener también una importancia especial para las características funcionales de una matriz según la invención, p. ej., un ligando puede mostrar un alto grado de unión selectiva de inmunoglobulinas con una concentración de ligando, mientras que un aumento de la concentración del ligando da como resultado una disminución de la selectividad de la unión. Tal y como es bien sabido por un experto en la técnica, las concentraciones demasiado altas de ligando pueden conducir a una unión fuerte de impurezas indeseadas, gracias al mecanismo de puntos de unión múltiple, porque los ligandos están situados demasiado cerca en el espacio sobre el esqueleto en fase sólida. Si se mantiene baja la concentración de ligando, los ligandos estarán separados con distancias mayores y por ello, no se produce la unión de impurezas debido a la unión en sitios múltiples.

Otro efecto negativo de una concentración demasiado alta del ligando, es el riesgo de unir la proteína deseada, p. ej., la inmunoglobulina, por múltiples sitios de unión. Tal unión múltiple, puede conducir a dificultades en la liberación de la proteína, p. ej., la inmunoglobulina, con un tampón de elución apropiado. A veces, puede ser incluso necesario utilizar condiciones de desnaturalización muy fuertes y disolventes orgánicos, para liberar el producto de tales matrices en fase sólida altamente sustituidas - con una pérdida de la actividad biológica como consecuencia.

La concentración de ligando en matrices en fase sólida se puede describir de diversos modos. Una forma de describir la concentración de ligando, es describir la cantidad de ligando presente por gramo de materia seca (p. ej., en  $\mu\text{mol/g}$  de materia seca). Éste es el resultado obtenido directamente si por ejemplo la concentración de ligando se mide por análisis elemental de muestras secas (p. ej., liofilizado) de la matriz en fase sólida. La concentración del ligando, sin embargo, también se puede describir como la cantidad de ligando presente en un ml de matriz en fase sólida húmeda y sedimentada (también designada a menudo como un ml de matriz de lecho compacto). Ésta es una cifra que se calcula fácilmente a partir de una determinación basada en la matriz en fase sólida seca (p. ej.,  $\mu\text{mol/g}$  de materia seca), si el contenido en materia seca de la matriz en fase sólida hidratada se ha determinado al mismo tiempo (es decir, gramo de materia seca/ml de matriz en fase sólida sedimentada y húmeda). Otro modo de describir la concentración del ligando es como la cantidad de ligando presente en un gramo de matriz húmeda pero drenada bajo aspiración. Esta cifra se calcula también fácilmente a partir de una determinación basada en la materia seca, si el contenido en materia seca en la fase sólida por gramo de matriz húmeda pero drenada, se ha determinado al mismo tiempo.

Por tanto, la concentración de ligando de las matrices en fase sólida descrita en esta memoria, está en el intervalo 10-120  $\mu\text{mol/ml}$  de matriz en fase sólida sedimentada e hidratada, preferentemente 15-100  $\mu\text{mol/ml}$ , en particular 20-80  $\mu\text{mol/ml}$ .

Como debe ya estar claro por lo anterior, el objeto de la presente invención es proporcionar matrices en fase sólida que tienen una eficacia de la unión alta.

De este modo, las matrices en fase sólida, que son útiles dentro del alcance de la presente invención, deben satisfacer los criterios (i) e (ii), o los criterios (ii) y (iii). Preferentemente, se tienen que cumplir los tres criterios.

En relación con el criterio (i), es altamente deseable junto con los otros criterios descritos en esta memoria o como una alternativa de los mismos, que la matriz en fase sólida tenga una eficacia de la unión de al menos 50%, cuando es sometida a ensayo con un pH en el intervalo de 2,0 a 10,0 en el “Ensayo convencional de la unión de inmunoglobulinas” descrito en esta memoria. Se prevé que la eficacia máxima de la unión (que se puede estimar de

## ES 2 332 893 T3

forma absolutamente exacta, en media unidad de pH, sometiendo a ensayo la eficacia de la unión en un intervalo de pH usando, p. ej., incrementos de 0,5 unidades de pH) de la mayoría de las matrices según la invención, está en el intervalo de 3,0 a 9,0, p. ej., en el intervalo de 3,0 a 7,0 o en el intervalo de 6,0 a 9,0, dependiendo de la naturaleza del ligando.

Se ha observado que la eficacia de la unión a pH 4,5 y a pH 7,0 es especialmente crucial, cuando se realiza una evaluación general de una matriz en fase sólida para el aislamiento de inmunoglobulinas, así, en una realización preferida, la presente invención se refiere a una matriz en fase sólida que tiene una eficacia de la unión de al menos 50% a pH 4,5 o a pH 7,0, en el “*Ensayo convencional de la unión de inmunoglobulinas*” descrito en esta memoria.

Por ello, en una realización particularmente interesante de la presente invención, la matriz en fase sólida tiene una eficacia de la unión de al menos 50%, preferentemente al menos 60%, más preferentemente al menos 70%, en particular al menos 80%, tal como por lo menos 90%, en el “*Ensayo convencional de la unión de inmunoglobulinas*” descrito en esta memoria, al menos un valor de pH del disolvente en el intervalo de pH 1,0 a pH 11,0, en particular en el intervalo de pH 3,0 a pH 9,0, y más particularmente a pH 4,5 o 7,0.

Además, es también un objeto de la presente invención, proporcionar matrices en fase sólida que sean capaces de unirse a una amplia gama de inmunoglobulinas, de modo que el usuario final pueda confiar en una matriz en fase sólida en vez de una variedad de productos que se tienen que someter a ensayo individualmente para cada clon de inmunoglobulinas.

Por tanto, en relación con el criterio (ii), la matriz en fase sólida tiene preferentemente una eficacia de la unión promedio de al menos 50%, tal como al menos 60%, preferentemente al menos 70%, especialmente al menos 80%, en particular al menos 90%, para las inmunoglobulinas sometidas a ensayo en el “*Ensayo convencional de la unión de inmunoglobulinas*”, cuando se somete a ensayo a un pH en el intervalo de 2,0 a 10,0, tal como en el intervalo de 3,0 a 9,0, p. ej., en el intervalo de 3,0 a 7,0, o en el intervalo de 6,0 a 9,0. Típicamente, la eficacia de la unión se determina con dos valores de pH, p. ej., a pH 4,5 y a pH 7,0, y el óptimo se encuentra entonces variando el valor pH en incrementos de 0,5 alrededor de uno de los dos valores de pH, proporcionando la eficacia de la unión más prometedora.

La estabilidad funcional de la matriz, que es interesante e importante en relación con un riesgo menor de lixiviación y la posibilidad de regeneración, se puede influir por la estructura química del ligando, es decir, la estabilidad en condiciones de regeneración rigurosas, tales como hidróxido sódico 1 M, depende de la estructura del ligando, así como el esqueleto de la matriz y cualquier resto del espaciador.

Por lo tanto, en relación con el criterio (iii), la estabilidad (véase el ejemplo 8) de la matriz en fase sólida en NaOH 1 M, es tal que la incubación de la matriz en NaOH 1 M en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 7 días, reduce la eficacia de la unión a un pH en el intervalo de una unidad de pH menos que el pH máximo de la unión, hasta una unidad de pH más elevada que el valor de pH máximo de la unión, tal y como se determina en el “*Ensayo convencional de la unión de inmunoglobulinas*” descrito en esta memoria, con menos de 50%, preferentemente menos de 25%, comparado con una matriz sin tratar, correspondiente. Preferentemente, la reducción es menor del 15%, por ejemplo menor del 10%, en particular menor del 5%.

Se ha observado que las matrices en fase sólida que comprenden un esqueleto funcionalizado de la matriz, que es portador de una pluralidad de grupos funcionales de la fórmula siguiente



en donde M designa el esqueleto de la matriz; SP1 designa un espaciador; X designa -O-, -S- o -NH-; A designa un resto aromático o heteroaromático opcionalmente sustituido con un monociclo o un biciclo; SP2 designa un espaciador opcional; y ACID designa a grupo ácido;

con la primera condición de que el peso molecular del ligando -L sea como máximo 500 Dalton,

son muy adecuadas para el aislamiento y/o la purificación de inmunoglobulinas, así como para el aislamiento y/o la purificación de proteínas y de otras biomoléculas en general.

Además se ha observado que las matrices en fase sólida mencionadas anteriormente, que comprenden grupos funcionales de fórmula M-SP1-X-A-SP2-ACID, se pueden aplicar igualmente a la unión reversible dependiente del pH, de proteínas y de otras biomoléculas.

El pH de la solución que contiene las proteínas está preferentemente en el intervalo de 2,0 a 6,0, especialmente en el intervalo de 3,0 a 5,5, tal como 4,0 a 5,0, y el pH del eluyente está en el intervalo de 6,0 a 11, preferentemente en el intervalo de 6,0 a 9,0.

Como en el método para el aislamiento de las inmunoglobulinas, el contenido total en sales de la solución que contiene las proteínas se corresponde preferentemente con una fuerza iónica de como máximo 2,0, tal como en el

intervalo de 0,05 a 2,0, en particular en el intervalo de 0,05 a 1,4, especialmente en el intervalo de 0,05 a 1,0, y/o la concentración de sales liotrópicas es preferentemente como máximo 0,4 M, tal como máximo 0,3 M, en particular como máximo 0,2 M, especialmente como máximo 0,1 M. Además, como se ha indicado anteriormente, es ventajoso el uso de un detergente cargado negativamente en la etapa de puesta en contacto (operación (a)) y/o en la etapa de lavado (operación (c)). Preferentemente, la etapa de lavado (operación (c)), implica preferentemente el uso de un tampón de sales inorgánicas u orgánicas que comprende un detergente cargado negativamente.

#### *Síntesis de las matrices en fase sólida*

Generalmente, una matriz en fase sólida se puede derivatizar de modo que comprenda ligandos enlazados covalentemente de acuerdo con la invención, por métodos conocidos por sí mismos, p. ej., la activación de la matriz en fase sólida con un reactivo adecuado conocido por sí mismo, seguida del acoplamiento del ligando a la matriz activada, incorporando opcionalmente un espaciador SPA entre el ligando y la matriz, mediante el acoplamiento del espaciador a la matriz activada, seguido en primer lugar por el acoplamiento del ligando con el espaciador a través de un reactivo de condensación adecuado, o incluso de una segunda activación del espaciador seguida del acoplamiento del ligando.

La secuencia y la elección de los reactivos puede depender del ligando real que se va a acoplar y del material de la fase sólida que se va a derivatizar, considerando, p. ej., el contenido en grupos reactivos, tales como hidroxilo, amino, mercapto, y silanoles etc. En algunos casos puede ser preferible activar o derivatizar el ligando, en lugar de la matriz en fase sólida, seguido de una reacción del ligando derivatizado con la matriz en fase sólida.

Por tanto, en un método preferido para sintetizar una matriz en fase sólida de acuerdo con la invención, la matriz en fase sólida reacciona en primer lugar con un reactivo capaz de reaccionar con la matriz en fase sólida y activarla de este modo para la reacción posterior con el ligando, eliminando opcionalmente por lavado el reactivo de activación, seguido por una reacción de la matriz en fase sólida activada con una solución que comprende el ligando y seguido opcionalmente por el lavado de la matriz en fase sólida que comprende el ligando inmovilizado covalentemente, lavando con una o varias soluciones de limpieza adecuadas la matriz para eliminar un excedente de reactivo.

En algunos casos, se puede combinar la activación y el acoplamiento del ligando, mezclando los dos reactivos y dejando que las dos reacciones transcurran en paralelo. Esto es una grande ventaja, ya que ahorra costes y tiempo, a la vez que se reduce el volumen de agua residual. De este modo, la etapa de activación y de acoplamiento se realizan preferentemente en una etapa combinada.

Además, es una ventaja significativa si la reacción de activación y/o de acoplamiento se pueden realizar sin necesidad de añadir disolventes orgánicos al medio de reacción. Estos disolventes orgánicos se emplean frecuentemente para solubilizar los reactivos de la reacción o para asegurar que la hidrólisis de especies reactivas se mantenga al mínimo. Sin embargo, el uso de disolventes orgánicos aumenta el coste y el riesgo del procedimiento, debido al riesgo de explosiones, al riesgo de daños para la salud, a los problemas con los desechos y al coste relativamente alto de los disolventes mismos. Por ello, el proceso de activación y/o de acoplamiento se realiza preferentemente sin la adición de ningún disolvente orgánico al medio de reacción.

#### **Ejemplos**

La invención se ilustra con los ejemplos 1-15 a continuación:

##### *1. Derivatización de fases sólidas*

##### *1A) Activación con epíclorohidrina de las perlas de agarosa*

*Activación de perlas de agarosa procedentes de Hispanagar*

*Nivel "alto" de activación:*

Aproximadamente 1000 ml de una suspensión 1:1 de perlas de agarosa en agua (Hispanagar, perlas de agarosa al 6%, tamaño de partícula 100-140  $\mu\text{m}$ ) se lavaron con agua desmineralizada, en un embudo de vidrio sinterizado, seguido por el drenaje bajo aspiración durante un minuto. Se pesaron 700 gramos de perlas de agarosa húmedas, pero drenadas, en una mezcla de 560 ml de agua y 70 ml de hidróxido sódico al 32,5% de peso/volumen. A esta suspensión se añadieron a continuación 90 ml de epíclorohidrina (ALDRICH nº de cat.: E105-5) seguido por una agitación suave con una paleta, a temperatura ambiente (20-25°C) durante 6 horas. Las perlas de agarosa se lavaron a continuación en un filtro con aspiración con aproximadamente 20 litros de agua y finalmente se suspendieron en agua. Se observó que las perlas de agarosa activadas eran estables en esta suspensión durante varias semanas, cuando se almacenaban a 4°C.

La concentración de grupos epoxi activos sobre las perlas de agarosa activadas fue determinada mediante valoración con tiosulfato, tal y como se describe en Porath, J., Låås, T., Janson, J.-C. Journal of Chromatography, volumen 103, págs. 49-69, 1975 y Sundberg, L., & Porath, J., Journal of Chromatography, volumen 90, págs. 87-98, 1974. Los resultados de esta valoración indicaban que las perlas activadas tenían una concentración de 70  $\mu\text{mol}$  de grupos epoxi por gramo de perlas húmedas, pero drenadas bajo aspiración, correspondientes a 972  $\mu\text{mol/g}$  de materia seca, o a 54  $\mu\text{mol/ml}$  de perlas sedimentadas y húmedas (solución acuosa).

*Nivel “bajo” de activación:*

Para la producción de una matriz con un contenido más bajo en grupos epoxi activos, se siguió el mismo procedimiento que el descrito anteriormente, con la excepción de que la mezcla de reacción consistía en: 200 g de perlas de agarosa húmedas, pero drenadas bajo aspiración, 160 ml de agua, 20 ml de hidróxido sódico 2 M y 11,5 ml de epíclorohidrina.

La valoración con tiosulfato indicaba la presencia de 21  $\mu\text{mol}$  de grupos epoxi por gramo de perlas húmedas, pero drenadas bajo aspiración, que se corresponden a 292  $\mu\text{mol/g}$  de materia seca, o a 16  $\mu\text{mol/ml}$  de perlas húmedas y sedimentadas (solución acuosa).

*Activación de las perlas de agarosa procedentes de Pharmacia y de Biorad*

El mismo procedimiento de activación que el descrito anteriormente, fue empleado para la activación de las perlas de agarosa de Pharmacia (Sephacrose 4B y Sepharose 6B) y de Biorad (gel Biogel A-5m con tamaño de partícula 38-75  $\mu\text{m}$  y gel Biogel A-15m con tamaño de partícula 75-150  $\mu\text{m}$ ).

La valoración de los grupos epoxi activos sobre estas fases sólidas, proporcionó los siguientes resultados:

$\mu\text{mol}$  de grupos epoxi por gramo de perlas drenadas:

Sephacrose 4B:	40
Sephacrose 6B:	52
Gel Biogel A 5m:	65
Gel Biogel A 15m:	46

*1B) Activación con epíclorohidrina del Fractogel*

El Fractogel TSK HW-55 (F), con tamaño de partícula 32-63  $\mu\text{m}$ , de MERCK (nº de cat.: 14981) y el Fractogel TSK HW-65 (F), con tamaño de partícula 32-63  $\mu\text{m}$ , de MERCK (nº de cat.: 14984) fueron activados con epíclorohidrina con el mismo procedimiento que el descrito anteriormente para las perlas de agarosa. La concentración resultante de grupos epoxi activos sobre estas fases sólidas era 98 y 53  $\mu\text{mol/g}$  de perlas drenadas, respectivamente.

*1C) Activación con éter diglicídico de butanodiol de las perlas de agarosa*

Se lavaron 100 gramos de perlas de agarosa al 6% de Hispanagar, con agua en un embudo de vidrio sinterizado y se drenaron bajo aspiración durante un minuto. Las perlas se suspendieron a continuación en 75 ml de NaOH 0,6 M y de aquí en adelante se añadieron 75 ml de éter diglicídico de 1,4-butanodiol. Se agitó suavemente con una paleta, a temperatura ambiente, durante 18 horas, después de lavar la matriz con agua (aproximadamente 3 litros).

La valoración con tiosulfato de la cantidad de grupos epoxi incorporados en la matriz, dio un contenido de 55  $\mu\text{mol/g}$  de matriz drenada bajo aspiración.

*1E) Acoplamiento de los ligandos a las matrices activadas**Procedimiento general de acoplamiento*

Todos los acoplamientos de diferentes ligandos a las matrices activadas, mencionadas en el ejemplo 1A-D, se realizaron según el siguiente procedimiento general:

- 1) Las perlas activadas fueron lavadas en un filtro con aspiración, con 2-3 volúmenes de agua desmineralizada. Las perlas se drenaron bajo aspiración ligera en un embudo de vidrio sinterizado y 20 g de gel húmedo, pero drenado se pesaron dentro de una botella de plástico de 100 ml con tapón a rosca.
- 2) Un g del ligando se disolvió en 20 ml de agua y se valoró a pH 10,5-11,0 con hidróxido sódico 2 M (para algunos ligandos con baja solubilidad, el pH se ajustó a pH 11,5-12,5). La solución resultante se mezcló con la matriz activada. El gel se incubó con la solución, mezclando suavemente en una mezcladora de rodillos, durante 18 horas a temperatura ambiente.
- 3) A continuación, el gel se lavó con 2 litros de agua.

En los casos en los que el ligando tenía escasa solubilidad en agua, se empleó una solución de etanol al 50% para la disolución, en lugar de seguir con la valoración a pH 10,5-11,0 con hidróxido sódico 2 M. En los mismos casos, el lavado final con agua fue sustituido por una etapa de lavado con 1 litro de etanol al 50%, seguida por otra etapa de lavado con 1 litro de agua.



## ES 2 332 893 T3

Siempre que era posible, se determinó la concentración del ligando acoplado sobre las matrices por análisis elemental de carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre. A veces, además era posible determinar la cantidad de ligando acoplado por la valoración del ácido-base de los grupos funcionales característicos sobre el ligando acoplado.

### *Acoplamiento de ligandos a perlas de agarosa al 6%, activadas con epoxi*

Las sustancias químicas siguientes (ligandos) se acoplaron a las perlas de agarosa al 6%, activadas con epiclorohidrina (Ejemplo 1-A) (Hispanagar, tamaño de partícula 100-140  $\mu\text{m}$ ), según el Procedimiento general de acoplamiento, descrito anteriormente:

Ácido 2-hidroxibenzoico, ácido 3-hidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido 2-hidroxicinnámico, ácido 3-hidroxicinnámico, ácido 4-hidroxicinnámico, ácido 3,5-dinitrosalicílico, ácido 2-hidrox-3-metoxibenzoico, ácido 3-hidrox-4-metoxibenzoico, ácido 2-hidrox-5-metoxibenzoico, ácido 4-hidrox-3-metoxibenzoico, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoico, ácido 2-amino-4,5-dimetoxibenzoico, ácido 5-sulfosalicílico, ácido 5-clorosalicílico, ácido 4-hidrox-3,5-dinitrobenzoico, ácido 2-aminobenzoico, ácido 3-aminobenzoico, ácido 4-aminobenzoico, ácido 2-amino-3,5-diiodobenzoico, ácido 2-mercaptobenzoico, ácido 2-mercaptonicotínico, ácido anilín-2-sulfónico, ácido 2-piridilhidroximetanosulfónico, ácido 5-mercapto-1-tetrazolacético, ácido 1-hidrox-2-naftoico, ácido 3-hidrox-2-naftoico, ácido 2-hidrox-1-naftoico, ácido piridin-2,3-dicarboxílico, ácido 4-piridiltioacético, ácido 2-pirimidiltioacético, ácido 4-amino-2-clorobenzoico, ácido 3-amino-4-clorobenzoico, ácido 2-amino-5-clorobenzoico, ácido 2-amino-4-clorobenzoico, ácido 2-amino-5-nitrobenzoico, ácido 4-aminosalicílico, ácido 5-aminosalicílico, ácido 3,4-diaminobenzoico, ácido 3,5-diaminobenzoico, ácido 4-aminometilbenzoico, ácido 5-aminoisoftálico y ácido 4-aminoftálico, ácido 4-aminohipúrico, ácido 3-amino-1,2,4-triazol-5-carboxílico, ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, ácido 2-(4-aminofeniltio)acético, 2-amino-4-nitrofenol, ácido 4-aminofenilacético, ácido 1-aminociclohexanocarboxílico.

La concentración de los ligandos según se determinó por un análisis elemental sobre muestras liofilizadas, en las matrices respectivas, estaba generalmente en el intervalo entre 50 a 70  $\mu\text{mol}$  de ligando por gramo de matriz húmeda, pero drenada bajo aspiración.

### *1F) Acoplamiento de ligandos a diferentes fases sólidas*

Las siguientes fases sólidas distintas: perlas de agarosa activadas con epoxi de Hispanagar, activadas a un nivel bajo (Ejemplo 1-A), perlas de agarosa activadas con epoxi de Pharmacia y de Biorad (Ejemplo 1-A), Fractogel activado con epoxi de Merck (Ejemplo 1-B) y perlas de agarosa activadas con éter diglicídico de butanodiol de Hispanagar (Ejemplo 1-C), se acoplaron cada una con ácido 2-mercapto-benzoico (2-MBA) y ácido 4-amino-benzoico (4-ABA).

El procedimiento general de acoplamiento descrito anteriormente en el Ejemplo 1-E, se siguió durante todos los acoplamientos.

Las concentraciones de ligando obtenidas fueron determinadas por análisis elemental sobre muestras liofilizadas de las matrices respectivas, y se calcularon y se dan como  $\mu\text{mol}$  de ligando por gramo de matriz húmeda, pero secada bajo aspiración (un gramo de matriz húmeda, pero secada bajo aspiración se corresponde a aproximadamente 1,1-1,3 ml de perlas sedimentadas, mientras que el contenido en materia seca puede variar considerablemente más entre los tipos diferentes de perlas).

### *Concentración de ligando para las matrices sintetizadas en fase sólida*

(indicada como  $\mu\text{mol/g}$  de perlas húmedas, pero drenadas bajo aspiración)

Perlas de agarosa activadas con epoxi de Hispanagar, activadas a un nivel bajo (ejemplo 1-A):

2-MBA	4-ABA
18	20

## ES 2 332 893 T3

Perlas de agarosa activadas con epoxi de Pharmacia y de Biorad (Ejemplo 1-A):

Matriz/Ligando	2-MBA	4-ABA
Sepharose 4B	37	40
Sepharose 6B	51	47
Biogel A 5m	59	60
Biogel A 15m	44	43

Fractogel activado con epoxi de Merck (Ejemplo 1-B):

Matriz/Ligando	2-MBA	4-ABA
Fractogel TSK HW-55	96	92
Fractogel TSK HW-65	53	51

Perlas de agarosa activadas con éter diglicídico de butanodiol de Hispanagar (Ejemplo 1-C):

2-MBA	4-ABA
51	48

### 2. Ensayo convencional de la unión de inmunoglobulina

Con el fin de someter a ensayo todos los materiales en fase sólida diferentes, sintetizados según el ejemplo 1, se ideó un ensayo normalizado, que se puede reproducir en cualquier momento. El ensayo se diseñó para determinar la eficacia de la unión de la inmunoglobulina, de diferentes matrices bajo condiciones normalizadas, en relación con la composición y el pH de la materia prima.

Para asegurar una calidad máxima del ensayo para aislar anticuerpos monoclonales a partir del material sobrenadante de cultivos celulares diluidos, simulamos las condiciones utilizadas para cultivar células de hibridoma, mezclando un medio de cultivo celular típico con suero de ternera fetal, y añadimos a este "material sobrenadante de cultivo artificial", la inmunoglobulina de ratón purificada. Todos los reactivos son reactivos convencionales y a disposición comercial.

#### Definición de "material sobrenadante del cultivo artificial"

Para una solución de 250 ml:

236,5 ml de medio de crecimiento del cultivo celular, DMEM (Imperial, GB, n° de cat.: 7-385-14)

12,5 ml de suero de ternera fetal (Life Technologies, Dinamarca, n° de cat.: 10106-060) 1,0 ml de IgG de múrido policlonal purificada (Sigma, EE.UU., n° de cat.: 1-8765, 10 mg/ml)

0,244 g de azida sódica (Sigma, EE.UU., n° de cat: S-2002),

dando como resultado una solución que contenía: 40  $\mu$ g de IgG de múrido/ml, 5% de suero de ternera fetal y azida sódica 15 mM, y que tenía un pH de aproximadamente. 8,0.

Se observó que esta solución era estable a 4°C durante varias semanas, sin ningún deterioro de las inmunoglobulinas.

## ES 2 332 893 T3

### *Procedimiento convencional*

1) Aproximadamente 100 mg de la matriz que se va a someter a ensayo, se lavan con 10 ml de agua desmineralizada, en un embudo de vidrio sinterizado, seguido de drenaje bajo aspiración durante 60 segundos. 100 mg de la matriz en fase sólida, húmeda (drenada) se pesan en un tubo de ensayo de 3 ml y se añaden 2,50 ml de “material sobrenadante del cultivo artificial” que tiene el valor de pH con el que se va a someter a ensayo la matriz. El tubo de ensayo se cierra con un tapón, y la suspensión se incuba en una mezcladora de rodillos, durante 2 horas a temperatura ambiente (20-25°C). El tubo de ensayo se centrifuga a continuación durante 5 min., a 2000 rpm para sedimentar la matriz. El material sobrenadante se aísla a continuación de la matriz en fase sólida, pipeteado en un tubo de ensayo distinto, para evitar la transferencia de cualquier partícula de la matriz. A continuación, se realiza una determinación de la concentración de la inmunoglobulina no unida en el material sobrenadante, mediante una sola inmunodifusión radial (tal y como se describe en D. Catty y C Raykundalia “Antibodies - a practical approach” vol. 1, págs. 137-168, 1988) usando inmunoglobulinas anti-ratón de conejo, como anticuerpo que precipita (DAKO, Dinamarca, n° de cat.: Z109).

El porcentaje de inmunoglobulina de ratón unida a la matriz, se calcula a continuación según la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de unión} = (1 - (\text{conc. del sobrenadante} / \text{conc. del material de partida})) \times 100\%$$

La precisión de este método es superior a +/- 5%.

### *2A) Escrutinio para encontrar una eficacia alta de la unión de la inmunoglobulina*

El procedimiento convencional descrito anteriormente para el ensayo de la eficacia de la unión, se empleó para el ensayo de una amplia gama de diferentes matrices en fase sólida, basadas en perlas de agarosa al 6% activadas con epíclorohidrina de Hispanagar y sintetizadas según el Ejemplo 1 A y 1 E.

Los resultados del ensayo de la unión realizado a pH 4,5 y a pH 7,0, respectivamente, se presentan en la Tabla 1 a continuación:

TABLA 1

Ligando	Capacidad a pH 4,5	Capacidad a pH 7,0
ácido 2-hidroxibenzoico	0	0
ácido 3-hidroxibenzoico	0	30
ácido 4-hidroxibenzoico	0	0
ácido 2,5-dihidroxibenzoico	60	0
ácido 2-hidroxicinnámico	20	0
ácido 3-hidroxicinnámico	80	0
ácido 4-hidroxicinnámico	40	0
ácido 3,5-dinitrosalicílico	0	0

ES 2 332 893 T3

	ácido 2-hidroxi-3-metoxibenzoico	0	0
5	ácido 3-hidroxi-4-metoxibenzoico	40	0
	ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico	0	0
	ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico	0	0
10	ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoico	0	30
	ácido 2-amino-4,5-dimetoxibenzoico	20	0
	ácido 5-sulfosalicílico	0	0
15	ácido 5-clorosalicílico	0	0
	ácido 4-hidroxi-3,5-dinitrobenzoico	0	0
20	ácido 2-aminobenzoico	80	0
	ácido 3-aminobenzoico	100	0
	ácido 4-aminobenzoico	90	0
25	ácido 2-amino-3,5-diiodobenzoico	0	0
	ácido 2-mercaptobenzoico	100	0
	ácido 2-mercaptonicotínico	100	0
30	ácido anilin-2-sulfónico	0	0
	ácido 2-piridilhidroximetanosulfónico	0	0
35	ácido 5-mercapto-1-tetrazolacético	70	0
	ácido 1-hidroxi-2-naftoico	0	0
	ácido 3-hidroxi-2-naftoico	0	0
40	ácido 2-hidroxi-1-naftoico	60	0
	ácido piridin-2,3-dicarboxílico	0	0
45	ácido 4-piridiltioacético	0	0
	ácido 2-pirimidiltioacético	0	0
	ácido 4-amino-2-clorobenzoico	0	40
50	ácido 3-amino-4-clorobenzoico	0	0
	ácido 2-amino-5-clorobenzoico	80	0
	ácido 2-amino-4-clorobenzoico	40	0
55	ácido 2-amino-5-nitrobenzoico	0	0
	ácido 4-aminosalicílico	80	20
60	ácido 5-aminosalicílico	80	30
	ácido 3,4-diaminobenzoico	80	0
	ácido 3,5-diaminobenzoico	60	0
65	ácido 4-aminometilbenzoico	0	0

	ácido 5-aminoisoftálico	60	20
5	ácido 4-aminoftálico	60	20
	ácido 4-aminohipúrico	0	20
	ácido 3-amino-1,2,4-triazol-5-carboxílico	0	20
10	ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico	80	20
	ácido 2-(4-aminofeniltio)acético	80	0
	ácido 4-aminofenilacético	0	0
15	ácido 1-aminociclohexanocarboxílico (referencia)	0	0

Como se observa en la tabla, algunos ligandos no se unen en absoluto a la inmunoglobulina, mientras que otros muestran una eficacia de la unión muy alta, en el intervalo de 80-100%, y todavía otros ligandos muestran eficacias de la unión intermedias, en el intervalo de 30-60%.

Como se puede observar por el resultado del ácido 1-aminociclohexanocarboxílico (referencia), parece que es necesario un resto aromático o heteroaromático para una unión eficaz.

### 3. Ensayo de la unión a una matriz de anticuerpos monoclonales

El siguiente ejemplo ilustra las diferencias en la eficacia de la unión obligatoria entre matrices en fase sólida de la técnica anterior y matrices en fase sólida de acuerdo con la invención, para la purificación de inmunoglobulinas.

Para el estudio comparativo 7, se adquirieron diferentes líneas celulares capaces de producir 7 anticuerpos monoclonales diferentes, a partir de la "American Type Culture Collection" (ATCC), y se propagaron según un procedimiento convencional, tal y como se describe a continuación. De aquí en adelante, se sometió a ensayo la eficacia de la unión de cada anticuerpo monoclonal con cada una de las fases sólidas: agarosa con proteína A (matriz de la técnica anterior), Avidchrom (matriz de la técnica anterior) y agarosa con ácido 2-mercapto-benzoico ligada a epoxi y agarosa con ácido 4-amino-benzoico.

El estudio se diseñó para determinar la eficacia de la unión del anticuerpo durante la incubación por lotes, de las 5 fases sólidas diferentes con el material sobrenadante procedente de los cultivos de 7 líneas celulares diferentes, disponibles comercialmente.

#### Anticuerpos monoclonales

**Líneas celulares:** Las siguientes siete líneas celulares a disposición en la "American Type Culture Collection" se incluyeron en el sistema normalizado:

<i>nº de cat. de la ATCC</i>	<i>Tipo de inmunoglobulina producida</i>
HB 134	IgG <sub>1</sub> de ratón
HB 8279	IgG <sub>2b</sub> de ratón
HB 8445	IgG <sub>3</sub> de ratón
CRL 1852	IgG <sub>1</sub> de ratón
HB 121	IgG <sub>2a</sub> de ratón
HB 8857	IgG <sub>1</sub> de rata
CRL 8018	IgM de ratón

*Cultivos:* El material sobrenadante del cultivo del anticuerpo monoclonal utilizado en el estudio, se produjo cultivando las células de hibridoma de ratón y de rata correspondientes, en un medio que contenía suero de ternera fetal (RPMI-X, Mediatech, Dinamarca nº de cat. 20230500 + 5% de suero de ternera fetal, Imperial, Reino Unido, nº de cat. 83041). La metodología utilizada para cultivar las cinco líneas celulares está bien establecida en la técnica anterior y está descrita por G. Brown y N.R. Ling "Antibodies - a practical approach", vol.1, págs. 81-104, 1988). Después de 3 semanas de cultivo, se retiraron las células por centrifugación y el material sobrenadante se filtró para eliminar cualquier partícula restante. La concentración del anticuerpo monoclonal en el material sobrenadante de los cinco cultivos diferentes, se determinó por inmunodifusión radial simple (tal y como describen D. Catty y C. Raykundalia "Antibodies - a practical approach" vol.1, págs. 137-168, 1988), empleando inmunoglobulinas anti-ratón de conejo e inmunoglobulinas anti-rata de conejo, como anticuerpos para precipitar (DAKO, Dinamarca, nº de cat.: Z109 y Z147) y se observó que estaba en el intervalo de 30 a 60 µg/ml para todos los clones. Más allá, el contenido en anticuerpo monoclonal en cada material sobrenadante de los cultivos, se normalizó por dilución, hasta alcanzar una concentración final de 30 µg/ml. Para asegurar unas condiciones similares para todo el material sobrenadante, la dilución se realizó con medio de cultivo que incluía 5% de suero de ternera fetal.

*Fases sólidas:* Agarosa con proteína A de Repligen Corporation, EE.UU., nº de cat.: IPA-300. número de lote: RN 2917; Avidchrom de Unisyn Technologies, EE.UU., nº de cat.: 3100-0025, nº de lote: 96-0404-1; agarosa con ácido 2-mercapto-benzoico y agarosa con ácido 4-amino-benzoico, se basaron en perlas de agarosa al 6% activada con epíclorohidrina de Hispanagar, España, y la síntesis es tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1 A y 1 E. Las concentraciones de ligando fueron medidas por análisis elemental y se encontró que eran 65, 69 y 69 µmoles/gramo de matriz húmeda pero drenada, respectivamente (correspondientes a 903, 958 y 958 µmoles/g de materia seca, tal y como se midió con un análisis elemental sobre muestras liofilizadas).

#### *Procedimiento convencional para el "Ensayo de unión a la matriz del anticuerpo monoclonal"*

Aproximadamente 100 mg de la matriz que se va a someter a ensayo se lavan con 10 ml de agua desmineralizada, en un embudo de vidrio sinterizado, seguido por drenaje bajo aspiración durante 60 segundos. Se pesan 100 mg de la matriz en fase sólida húmeda (drenada) en un tubo de ensayo de 3,0 ml y se añaden 4 ml de material sobrenadante del cultivo de anticuerpos monoclonales, ajustado al valor de pH con el que se va a someter a ensayo la matriz. El tubo de ensayo se cierra con un tapón, y la suspensión se incuba en una mezcladora de rodillos, durante 2 horas a temperatura ambiente (20-25°C). A continuación, el tubo de ensayo se centrifuga durante 5 min. a 2000 rpm, para sedimentar la matriz. El material sobrenadante se aísla a continuación de la matriz en fase sólida, pipeteando en un tubo de ensayo distinto, para evitar transferencia de cualquier partícula de la matriz. Después de esto, se realiza una determinación de la concentración de inmunoglobulina no unida en el material sobrenadante, mediante inmunodifusión radial simple.

El porcentaje de anticuerpo monoclonal unido a la matriz se calcula a continuación según la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje unido} = (1 - (\text{conc. en el material sobrenadante} / 30 \mu\text{g/ml}) \times 100\%$$

La precisión de este método es superior a +/- 5%.

#### *Ajustes del pH del material sobrenadante del cultivo para las diferentes fases sólidas*

*Agarosa con proteína A:* El material sobrenadante del cultivo de anticuerpos monoclonales se ajustó a pH 8,2, mediante la adición Tris/HCl hasta tener una concentración final de Tris de 0,05 M.

*Avidchrom:* El material sobrenadante del cultivo de anticuerpos monoclonales se ajustó a pH 7,4, mediante la adición de hidrógeno fosfato de potasio/HCl hasta tener una concentración final de fosfato de 0,05 M.

*Agarosa con ácido 2-mercapto-benzoico y ácido 4-amino-benzoico:* El material sobrenadante del cultivo de anticuerpos monoclonales se ajustó a pH 4,5 mediante la adición de ácido acético/hidróxido sódico hasta tener una concentración final de ácido acético de 0,05 M.

Eficacia de la unión en %

Clones				
Subtipo nº de cat. de ATCC	2-MBA	4-ABA	Proteína A	Avidchrom
IgG <sub>1</sub> de ratón HB 134	100	100	0	50
IgG <sub>3</sub> de ratón HB 8445	100	100	80	80
IgG <sub>1</sub> de ratón CRL 1852	100	100	20	40
IgG <sub>2b</sub> de ratón HB 8279	95	95	70	50
IgG <sub>2a</sub> de ratón HB 121	90	100	100	40
IgG <sub>1</sub> de rata HB 8857	95	100	95	100
IgM de ratón CRL 8018	85	60	0	10
% de la eficacia de la unión promedio	95	94	52	53
2-MBA: agarosa con ácido 2-mercapto-benzoico (epiclorohidrina)				
4-ABA: agarosa con ácido 4-amino-benzoico (epiclorohidrina)				

Como se puede observar en la tabla, las matrices en fase sólida según la invención, es decir, la agarosa con ácido 2-mercapto-benzoico y la agarosa con ácido 4-amino-benzoico, muestran una eficacia de la unión alta muy constante con los diferentes clones (típicamente en el intervalo de unión de 50-100%), mientras que las matrices en fase sólida de la técnica anterior, la agarosa con proteína A y Avidchrom, muestran una eficacia de la unión que varía mucho más (en el intervalo de unión de 0-100%). La eficacia de la unión promedio se ha calculado para cada adsorbente, y a partir de esos datos se ha observado que los adsorbentes de la técnica anterior con eficacias de la unión promedio de 52 y 53%, son significativamente menos eficaces que los adsorbentes según la invención, que tienen eficacias de la unión promedio en el intervalo de 75-95%.

#### 4. Ácido 2-mercaptobenzoico como ligando

##### Aislamiento de inmunoglobulinas bajo diferentes condiciones de unión y de lavado

Tal y como indican los resultados en la Tabla 1, el ácido 2-mercaptobenzoico parece ser un ligando muy interesante para el aislamiento y la purificación de anticuerpos monoclonales, a partir del material sobrenadante de cultivos diluidos. Otros estudios de esta matriz en fase sólida que empleaban el "material sobrenadante de un cultivo artificial", tal y como se ha descrito en el ejemplo 2, se realizaron por tanto con el objetivo de establecer las condiciones óptimas de la unión y del lavado, para conseguir la capacidad de unión máxima, así como un rendimiento y una pureza máximos del anticuerpo en el material eluido.

La agarosa con ácido 2-mercapto-benzoico se basaba en perlas de agarosa al 6% activadas con epiclorohidrina de Hispanagar y se sintetizaron tal y como se ha descrito en el ejemplo 1 A y 1 E. La concentración de ligando se midió con dos métodos diferentes y se observó que era 65  $\mu\text{mol/g}$  de matriz húmeda pero drenada, tal y como se determinó mediante el análisis elemental y 60  $\mu\text{mol/g}$  tal y como se determina con la valoración ácido-base de la parte de ácido benzoico inmovilizada del ligando.

Los experimentos se realizaron generalmente según el procedimiento siguiente:

- 1) Una parte alícuota pequeña de agarosa con ácido 2-mercaptobenzoico se lavó con agua (toda el agua, a menos que se indique de otra manera, tenía la calidad del agua de Milli Q) en un embudo de vidrio sinterizado, mediante aspiración suave, seguida por drenaje del agua intersticial mediante una aspiración ligera durante un minuto.
- 2) 0,1 gramos de la matriz húmeda, pero drenada se pesaron a continuación en un tubo de ensayo, seguido por la adición de 10 ml de "material sobrenadante del cultivo artificial" que tenía un valor de pH específico para ese experimento concreto. Con o sin otros aditivos cualesquiera, la suspensión se incubó de aquí en adelante en una mezcladora de rodillos durante dos horas a temperatura ambiente, para asegurar una unión eficaz de la inmunoglobulina.

## ES 2 332 893 T3

3) Después de la incubación, la matriz se transfirió a una columna con un diámetro interior de 5 milímetros, drenada para eliminar el exceso de “medio de cultivo artificial” y lavada según un esquema específico para el experimento concreto. El lavado se realizó añadiendo 4 x 4 ml de tampón de lavado a la columna y recogiendo el líquido que fluye a través de la columna en una fracción.

4) La elución final de la inmunoglobulina unida se realizó con un tampón de elución específico, mediante la adición 4 x 2,5 ml de tampón a la columna y recogiendo el material eluido en una fracción. No se empleó bombeo en los experimentos, todas las columnas fluyeron por gravedad (con un caudal aproximado de 0,5-1,0 ml/min).

5) Los análisis se realizaron para determinar la distribución relativa de la inmunoglobulina entre la fracción no unida en el material sobrenadante después de la unión, la(s) fracción(es) de lavado y el material eluido. Esto se realizó con inmunodifusión radial simple (tal y como se describe en D. Catty y C. Raykundalia “Antibodies - a practical approach” vol.1, págs. 137-168, 1988), empleando inmunoglobulinas anti-ratón de conejo, como anticuerpo para la precipitación (DAKO A/S, Dinamarca, nº de cat.: Z 109).

La *capacidad de unión* se calculó a continuación a partir de la cantidad de inmunoglobulina no unida, presente en el material sobrenadante y que se expresaba como el porcentaje de la cantidad total añadida a la matriz en la materia prima.

El *rendimiento* se calculó como el porcentaje de inmunoglobulina añadida encontrada en la fracción del material eluido (es decir, un rendimiento del 100% es igual que la presencia de 1 mg de IgG en el material eluido).

La *pureza* de la inmunoglobulina eluida se analizó con SDS-PAGE (electroforesis con poliacrilamida y dodecil-sulfato sódico) bajo condiciones reductoras, seguido de la tinción de las bandas de proteína con azul brillante de Coomassie. (Gel prefabricado con 4- 20% de tris-glicina, 1 mm, nº de cat.: EC6025, duración de la separación 1 hora a 30 mA; tampón de la separación tris-glicina SDS, nº de cat.: LC2675; tampón de la muestra tris glicina, nº de cat.: LC2676; equipo de reactivos para la tinción con Coomassie LC6025, todos los productos químicos son de Novex, EE.UU.)

El grado de pureza expresado como el porcentaje del contenido total en proteínas, se determinó examinando y procesando la imagen del gel de poliacrilamida teñido con Coomassie y seco. Para este fin, empleamos el sistema CREAM, disponible en Kem-En-Tec A/S, Dinamarca (nº de cat.: 6010 + 6050).

### 4A) Efecto de realizar la unión con diferentes valores de pH

El experimento siguiente fue realizado para establecer el intervalo de pH en el cual la matriz con ácido 2-mercapto-benzoico se uniría a las inmunoglobulinas de forma eficaz, del “material sobrenadante del cultivo artificial”. Tal y como se muestra en la tabla 1 del ejemplo 2, esta matriz se une al 100% con pH 4,5 y al 0% con pH 7,0. En este experimento la eficacia, el rendimiento y la pureza de la unión del material eluido se determina cuando se produce la unión en el intervalo de pH 3,0-6,5. En todos los casos, el tampón de lavado empleado era tampón de ácido cítrico de 10 mM, ajustado al mismo pH que el pH de la unión, con hidróxido sódico 1 M. El tampón de elución utilizado era en todos los casos ácido bórico 0,05 M/NaOH + cloruro sódico 0,5 M pH 8,6.

### Resultados

pH de la unión	Porcentaje de la unión	Rendimiento (%)	Pureza (%)
3,0	100	90	<5
3,5	100	95	<5
4,0	100	100	<5
4,5	100	100	<5
5,0	95	95	5
5,5	40	40	10
6,0	0	0	-
6,5	0	0	-

Como se puede observar en la tabla, se consigue una unión eficaz con valores de pH inferiores a 6,0, alcanzando el 100% con pH 4,5. Al mismo tiempo, hay una indicación de que se puede obtener una pureza relativamente superior si la etapa de la unión se realiza a un pH superior a 4,5.



## ES 2 332 893 T3

### 4B) Efecto de diferentes procesos de lavado/pH en el tampón de lavado

Se realizó una serie de ensayos con el objetivo de mejorar la pureza del material eluido, a la vez que se mantenía el rendimiento a un alto nivel. Para este fin, se sometió a ensayo una serie de procesos de lavado diferentes. Todos los ensayos se realizaron a pH 4,5, como pH de la unión, y todo el material se eluyó con ácido bórico 0,05 M/NaOH + NaCl 0,5 M, pH 8,6.

#### Resultados

	Tampón de lavado:	Pureza (%)	Rendimiento (%)
10	ácido cítrico 10 mM/NaOH pH 4,5	<5	100
	ácido cítrico 10 mM/NaOH pH 5,5	5	95
15	ácido cítrico 10 mM/NaOH pH 6,5	15	80
	Tris/HCl 20 mM pH 7,5	20	70
20	Tris/HCl 20 mM pH 8,5	20	60

Tal y como se puede observar en la tabla, la pureza del material eluido se puede incrementar lavando con un pH más elevado, pero un incremento del pH superior a pH 5,5, disminuye el rendimiento significativamente.

### 25 4C) Efecto de los diferentes procesos de lavado/sales liotrópicas a pH elevado

Los experimentos se realizaron tal y como se ha descrito en 3 B, salvo que se sometió a ensayo una serie de tampones de lavado que contenían diferentes sales liotrópicas a pH 8,0, para estudiar su capacidad para mejorar la pureza del material eluido, sin disminuir significativamente el rendimiento.

#### 30 Resultados

	Tampón de lavado:	Pureza (%)	Rendimiento (%)
35	sulfato de amonio 0,7 M/NaOH pH 8,0	ND	<10
	sulfato de amonio 0,9 M/NaOH pH 8,0	25	30
40	sulfato de amonio 1,0 M/NaOH pH 8,0	25	80
	sulfato de amonio 1,1 M/NaOH pH 8,0	20	95
	sulfato de amonio 1,3 M/NaOH pH 8,0	20	95
45	fosfato potásico 0,8 M pH 8,0	20	95
	fosfato potásico 1,0 M pH 8,0	15	95
	sulfato sódico 0,9 M/NaOH + bicarbonato sódico 0,05 M pH 8,0	20	95
50	cloruro sódico 1,0 M + bicarbonato sódico 0,05 M pH 8,0	20	95
	cloruro sódico 1,0 M + fosfato potásico 0,05 M pH 8,0	ND	0
	cloruro sódico 2,0 M + fosfato potásico 0,05 M pH 8,0	ND	0
55	cloruro sódico 4,0 M + fosfato potásico 0,05 M pH 8,0	20	80

Los resultados indican que la presencia de sales liotrópicas en el tampón de lavado, combinado con un pH más elevado que el pH de la unión, puede aumentar significativamente la pureza del material eluido, sin disminuir el rendimiento. También es evidente que es necesaria una cierta concentración de la sal liotrópica para obtener este resultado. Concentraciones demasiado bajas producen una pérdida de inmunoglobulina en la fracción de lavado, dando como resultado unos rendimientos muy bajos. Como se puede observar, la concentración necesaria depende de la naturaleza de la sal liotrópica, p. ej., el sulfato de amonio que se considera una sal liotrópica fuerte, según la serie de Hofmeister (véase Gagnon, citado en esta memoria), sólo tiene que tener una concentración de aproximadamente 1,0-1,1 M, para asegurar un alto rendimiento en el material eluido, mientras que el cloruro sódico, que se considera una sal liotrópica bastante débil según la serie de Hofmeister, necesita tener una concentración de aproximadamente 4 M antes de que el rendimiento aumente a un nivel aceptable.

## ES 2 332 893 T3

### 4D) Efecto de diferentes procesos de lavado/aditivos diferentes

El efecto de añadir detergentes y otros aditivos al tampón de lavado, fue investigado en los ensayos realizados tal y como se ha descrito anteriormente (el ejemplo 4 B y 4 C)

#### Resultados

		Pureza	Rendimiento
		(%)	(%)
10	Tampón de lavado:		
	ácido cítrico 0,01 M/NaOH pH 6,5 + 3 mg/ml de sulfato de octilo	50	80
	ácido cítrico 0,01 M/NaOH pH 5,8 + 0,05 mg/ml de bromofenol azul	70	90
15	sulfato de amonio 1,0 M/NaOH pH 7,5 + 10 mg/ml de ácido octano sulfónico	80	80
	sulfato de amonio 1,0 M/NaOH pH 8,0 + 5 mg/ml de laurilsarcosinato sódico	60	80
20	sulfato de amonio 1,0 M/NaOH pH 8,0 + 5 mg/ml de ácido octano sulfónico + 5 mg/ml de laurilsarcosinato sódico	80	70
25	fosfato potásico 0,9 M pH 9,2 + 5 mg/ml de ácido octano sulfónico	80	80
	fosfato potásico 0,9 M pH 9,2 + 5 mg/ml de ácido hexano sulfónico	60	90
	sulfato de amonio 1,0 M/NaOH pH 8,0 + 5 mg/ml de Tween 20	25	90
30	sulfato de amonio 1,0 M/NaOH pH 8,0 + 5 mg/ml de Pluronic F68	25	80

Los resultados de estos experimentos indican claramente el efecto positivo sobre la pureza del material eluido, obtenido lavando la matriz con tampones que contienen un detergente cargado negativamente (p. ej., ácido octano sulfónico, ácido hexano sulfónico, sulfato de octilo y laurilsarcosinato de sodio), mientras que la adición de detergentes sin carga, tales como Tween 20 y Pluronic F-68, parece que no tiene ningún efecto o muy poco sobre la pureza de la inmunoglobulina eluida. Asimismo, se observa que el azul de bromofenol, que es conocido por tener una alta afinidad para unirse a la albúmina (una impureza indeseada), también tiene un efecto significativo sobre la pureza, sin comprometer el rendimiento del producto. Además, el efecto obtenido parece ser independiente de si el tampón de lavado comprende concentraciones elevadas de sales liotrópicas o no, así como de la elección de la sal liotrópica empleada, si está presente.

### 4E) Efecto de diferentes aditivos durante la unión

Los experimentos siguientes se realizaron para investigar el efecto sobre la pureza y el rendimiento, de la adición de diferentes detergentes y otras sustancias químicas, al "material sobrenadante del cultivo artificial", durante la incubación con agarosa con ácido 2-mercapto-benzoico. Para todos los ensayos, el pH de la unión era pH 5,0, el tampón de lavado empleado era sulfato de amonio 1,1 M/NaOH pH 8,0 y el tampón de elución era ácido bórico 0,05 M/NaOH + cloruro sódico 0,5 M pH 8,6. Los experimentos fueron realizados de otra manera a la descrita en el procedimiento general anterior.

## ES 2 332 893 T3

### Resultados

	Sustancia añadida:	Pureza (%)	Rendimiento (%)
5	Ninguna	25	95
	5 mg/ml de Tween 20	30	80
	10 mg/ml de ácido benzoico	25	50
10	5 mg/ml de 1-octil-2-pirrolidona	20	80
	5 mg/ml de N-octanoil-N-metilglucamina	20	80
	1 mg/ml de lauril sulfobetaína	20	80
15	5 mg/ml de lauril sulfobetaína	ND	0
	5 mg/ml de ácido subérico	25	80
	5 mg/ml de ácido sebácico	25	80
20	5 mg/ml de ácido octano sulfónico	25	90
	5 mg/ml de ácido caproico	60	90
	5 mg/ml de ácido caprílico	70	80
25	0,5 mg/ml de de laurilsarcosinato sódico	70	90
	1,0 mg/ml de de laurilsarcosinato sódico	85	90
	2,0 mg/ml de de laurilsarcosinato sódico	90	70
30	1 mg/ml de azul de bromofenol	80	90

Los resultados indican que la adición de determinados detergentes cargados negativamente (o de sustancias anfipáticas) al “material sobrenadante del cultivo artificial” antes de la incubación con agarosa con ácido 2-mercapto-benzoico, tiene una influencia significativa sobre la pureza final del material eluido. Ésto es por ejemplo el caso de sustancias, tales como el ácido caproico y el ácido caprílico, así como el sarcosinato de laurilo, mientras que otras sustancias cargadas negativamente, tales como el ácido benzoico, la lauril sulfobetaína, el ácido subérico, el ácido sebácico y el ácido octano sulfónico parece que tienen muy poco efecto sobre las concentraciones sometidas a ensayo. También hay que tener en cuenta que parece que el detergente neutro Tween y el detergente positivo 1-octil-N-metilglucamina, no tienen ningún efecto.

#### 4F) Efecto de diferentes tampones de lavado junto con la adición de laurilsarcosinato sódico a la materia prima

El ejemplo siguiente muestra el efecto de combinar la adición de un detergente cargado negativamente a la materia prima, con una serie de diferentes composiciones de tampones de lavado. En todos los experimentos se añade 1 mg/ml de laurilsarcosinato sódico al “material sobrenadante del cultivo artificial”, antes de mezclar con la agarosa con ácido 2-mercapto-benzoico, el pH de la unión era pH 5,0 y el tampón de elución era en todos los casos ácido bórico 0,05 M/NaOH + cloruro sódico 0,5 M pH 8,6. Se siguió el procedimiento general descrito anteriormente.

*Resultados*

		Pureza	Rendimiento
		(%)	(%)
5	Tampón de lavado:		
	agua	45	90
	citrato sódico 0,001 M pH 6,0	45	90
10	citrato sódico 0,001 M pH 6,5	50	90
	citrato sódico 0,001 M pH 7,0	50	90
15	fosfato potásico 0,001 M pH 7,5	50	90
	citrato sódico 0,001 M pH 6,5 + 5% de monopropilenglicol	50	80
	citrato sódico 0,001 M pH 6,5 + 20% de monopropilenglicol	45	95
20	sulfato de amonio 1,0 M/NaOH pH 7,5	60	85
	sulfato de amonio 1,0 M/NaOH pH 7,0	60	90
25	sulfato de amonio 0,9 M/NaOH pH 7,0	60	75

*5. Ácido 4-amino-benzoico como ligando**Aislamiento de anticuerpos monoclonales bajo condiciones diferentes*

30 El ácido 4-amino-benzoico es otro ácido aromático según la invención, que parece ser muy interesante para el uso en la purificación de anticuerpos monoclonales (Tabla 1, ejemplo 2). Los ensayos siguientes muestran la influencia de diferentes condiciones de la unión y del lavado sobre el rendimiento de la agarosa con ácido 4-amino-benzoico, basada en agarosa al 6% de Hispanagar y sintetizada según el ejemplo 1 A y 1 E. La matriz utilizada fue analizada por análisis elemental y se determinó que tenía un contenido de 69  $\mu\text{mol}$  en grupos de ácido 4-amino-benzoico por ml de matriz húmeda, pero drenada.

Los ensayos fueron realizados tal y como se ha descrito en el procedimiento general en el ejemplo 4.

*40 5A) Efecto de realizar la unión a diferentes valores de pH*

El experimento siguiente se realizó para establecer el intervalo de pH en el cual la matriz de ácido 4-amino-benzoico se uniría eficazmente a las inmunoglobulinas procedentes del “material sobrenadante del cultivo artificial”. Tal y como se muestra en la Tabla 1 del ejemplo 2, a esta matriz se une el 90% a pH 4,5 y el 0% a pH 7,0. En este experimento se determina la eficacia, el rendimiento y la pureza de la unión del material eluido, en el intervalo de pH 4,0-6,5. En todos los casos, el tampón de lavado utilizado era tampón de ácido cítrico 10 mM ajustado al mismo pH que el pH de la unión con hidróxido sódico 1 M. El tampón de elución utilizado era en todos los casos ácido bórico 0,05 M/NaOH + cloruro sódico 0,5 M pH 8,6.

*50 Resultados*

	pH de la unión	Porcentaje de la unión	Rendimiento (%)	Pureza (%)
	4,0	100	90	10
55	4,5	90	95	10
	5,0	60	55	20
	5,5	20	ND	ND
60	6,0	0	ND	ND
	6,5	0	ND	ND

65 Tal y como se observa en la tabla, se consigue una unión eficaz con valores de pH inferiores a 5,5, alcanzando el 90% con pH 4,5. Al mismo tiempo, hay una indicio de que se puede obtener una pureza relativamente más alta si la etapa de la unión se realiza a un pH más elevado que 4,5.

## ES 2 332 893 T3

### 5B) Efecto de diferentes procesos de lavado/pH en el tampón de lavado

Se realizó una serie de ensayos con el objetivo de mejorar la pureza del material eluido, a la vez que se mantenía el rendimiento a un nivel elevado. Para este fin, se sometió a ensayo una variedad de procesos de lavado diferentes. Todos los ensayos se realizaron a pH 4,5, como pH de la unión y todo el material eluido se obtuvo con ácido bórico 0,05 M/NaOH + NaCl 0,5 M pH 8,6.

#### Resultados

	Pureza (%)	Rendimiento (%)
<b>Tampón de lavado:</b>		
ácido cítrico 10 mM/NaOH pH 4,5	10	90
ácido cítrico 10 mM/NaOH pH 5,5	25	90
ácido cítrico 10 mM/NaOH pH 6,0	60	80
ácido cítrico 10 mM/NaOH pH 6,5	75	55

Como se puede observar en la tabla, la pureza del material eluido se puede incrementar lavando con un pH más alto, pero con un incremento del pH por encima de pH 6,0, el rendimiento disminuye significativamente.

### 6. Ácido 2-mercapto-nicotínico

#### Aislamiento de anticuerpos monoclonales bajo diferentes condiciones

El ácido 2-mercapto-nicotínico es otro ácido aromático según la invención que parece ser muy interesante para el uso en la purificación de anticuerpos monoclonales (Tabla 1, ejemplo 2). Los ensayos siguientes muestran la influencia de diferentes condiciones de unión y de lavado sobre el rendimiento de la agarosa con ácido 2-mercapto-nicotínico, basada en agarosa al 6% activada con epíclorohidrina, procedente de Hispanagar y sintetizada según el ejemplo 1 A y 1 E. La matriz utilizada fue analizada por análisis elemental y se determinó que tenía un contenido de 63  $\mu$ mol de grupos de ácido 2-mercapto-nicotínico por ml de matriz húmeda, pero drenada.

Los ensayos fueron realizados tal y como se ha descrito en el procedimiento general en el ejemplo 4.

En estos dos ensayos, se investigó el efecto de variar el pH de la unión, sobre el rendimiento y la pureza del material eluido resultante, manteniendo constantes las condiciones de lavado y de elución. En ambos casos, el tampón de lavado era sulfato de amonio 1,1 M/NaOH pH 8,0 + 5 mg/ml de sulfato de octilo y el tampón de elución era ácido bórico 0,05 M/NaOH pH 8,6 + cloruro sódico 0,5 M.

El "material sobrenadante del cultivo artificial" se ajustó a pH 4,5 y 5,0 con ácido clorhídrico 1 M, respectivamente, y no se realizaron más adiciones.

#### Resultados

pH de la unión	Rendimiento (%)	Pureza (%)
4,5	85	80
5,0	75	95

Tal y como se puede observar, esta matriz proporciona un excelente rendimiento de inmunoglobulina en el material eluido, con ambos valores de pH de la unión, mientras que la pureza de la inmunoglobulina eluida está significativamente incrementada, elevando el pH de la unión desde pH 4,5 a pH 5,0.

### Efecto de añadir lauril sarcosinato sódico a la materia prima

En los siguientes ensayos se investiga el efecto de añadir diferentes cantidades de lauril sarcosinato de sodio al "material sobrenadante del cultivo artificial", con dos valores de pH diferentes. En todos los ensayos el tampón de lavado utilizado era sulfato de amonio 1,1 M/NaOH pH 7,5 y el tampón de elución era ácido bórico 0,05 M/NaOH pH 8,6 + cloruro sódico 0,5 M.

## ES 2 332 893 T3

Antes de mezclar con la matriz en fase sólida, se añadió el “material sobrenadante del cultivo artificial” y lauril sarcosinato de sodio con tres concentraciones diferentes y después el pH se ajustó a 4,5 y 5,0 con ácido clorhídrico 1 M, respectivamente.

### 5 Resultados

#### Unión con pH 4,5

Concentración de SLS, mg/ml	Rendimiento (%)	Pureza (%)
0,5	90	50
1,0	90	65
1,5	65	85

#### Unión con pH 5,0

Concentración de SLS, mg/ml	Rendimiento (%)	Pureza (%)
0,5	90	50
1,0	90	85
1,5	40	>95

SLS = Lauril sarcosinato de sodio

### 30 7. Ensayo de la estabilidad convencional

- I) Aproximadamente 1000 mg de la matriz que se va a someter a ensayo, se lavan con 100 ml de agua desmineralizada en un embudo de vidrio sinterizado, seguido por drenaje bajo aspiración durante 60 segundos. Se pesan 500 mg de la matriz en fase sólida húmeda (drenada) en un tubo de ensayo de 10,0 ml, marcado con “NaOH” y se añaden 9,0 ml de hidróxido sódico 1 M, después de mezclar suavemente durante 1 min.

Se pesan otros 500 mg de la matriz en fase sólida, húmeda (drenada) en un tubo de ensayo de 10 ml marcado con “agua” y se añaden 9,0 ml de agua, seguido de un mezclado suave durante 1 min.

Los tubos de ensayo se cierran herméticamente con tapones y se almacenan en la oscuridad, a temperatura ambiente (20-25°C) durante 7 días.

A continuación, se lavan las matrices por separado con 200 ml de agua en un embudo de vidrio sinterizado, seguido por drenaje bajo aspiración durante 60 segundos.

- II) Cada una de las matrices en fase sólida se someten a ensayo en el “*ensayo convencional de la unión de inmunoglobulina*”, definido en el ejemplo 2.

La estabilidad de la matriz en fase sólida frente al hidróxido sódico 1 M, se calcula a continuación y se expresa como un porcentaje, comparado con el testigo que sólo se ha incubado en agua según la siguiente fórmula:

$$\text{Estabilidad} = (\text{porcentaje de unión de matriz tratada con NaOH} / \text{porcentaje de unión del testigo}) \times 100\%$$

### 55 Resultados

Matriz en fase sólida	Estabilidad, %
agarosa con 2-mercapto-bencimidazol-divinil sulfona	0

Los resultados indican que las matrices producidas con agarosa activada con divinil sulfona tienen una estabilidad pobre en NaOH 1 M.

## 8. Aislamiento de anticuerpos policlonales a partir de diferentes especies

*Ácido 2-mercaptobenzoico como ligando*

5 El siguiente ejemplo ilustra la eficacia de la unión de la agarosa con ácido 2-mercaptobenzoico, frente a anticuerpos policlonales procedentes de diferentes especies, así como el rendimiento y la pureza del anticuerpo en el material eluido. Para el estudio se empleó el suero de 5 especies diferentes.

10 *Anticuerpos policlonales:* Los anticuerpos policlonales utilizados eran originarios del suero normal de las siguientes especies: cabra, caballo, conejo, cerdo y ser humano. Los sueros se obtuvieron a partir de sangre extraída recientemente, mediante centrifugación suave después de la coagulación, durante 24 horas a temperatura ambiente.

15 *Matriz en fase sólida:* la agarosa con ácido 2-mercaptobenzoico se basaba en perlas de agarosa al 6% activadas con epoxi de Hispanagar y se sintetizó tal y como se ha descrito en el ejemplo 1A y 1E. La concentración del ligando se midió por análisis elemental y se encontró que era 65  $\mu\text{mol}$ /gramo de matriz húmeda, pero drenada.

En la matriz en fase sólida se sometió a ensayo su eficacia de la unión a anticuerpos policlonales en una columna según el siguiente procedimiento:

20 1) La matriz se lavó con agua en un embudo de vidrio sinterizado y finalmente se drenó. Se pesó 1 gramo de la matriz en fase sólida, húmeda, pero drenada en una pequeña columna (diámetro interno de 5 mm). La matriz se lavó con 5 ml de tampón (citratato sódico 10 mM pH 5,0). Se aplicó 1 ml de la muestra (ajustada a pH 5,0 con ácido clorhídrico 1 M) a la columna. La columna se lavó con 20 ml de tampón de lavado I (sulfato de amonio 1,1 M pH 8,0 que contenía 5 mg/ml de 1 octanosulfonato sódico). La columna se lavó  
25 con 5 ml de tampón de lavado H (sulfato de amonio 1,1 M pH 8,0). La matriz se eluyó con 10 ml de tampón de elución (ácido bórico 0,05 M/NaOH + cloruro sódico 0,5 M pH 8,6). No se emplearon bombas en los experimentos, todas las columnas se eluyeron por gravedad (con un caudal aproximado de 0,5-1,0 ml/min).  
30 2) Se realizaron análisis para determinar la distribución relativa de la inmunoglobulina entre la fracción no unida eluida, después de la unión, la(s) fracción(es) de lavado y el material eluido. Esto se realizó por inmunodifusión radial simple (tal y como se ha descrito en D. Catty y C. Raykundalia "Antibodies - a practical approach" vol.1, págs. 137-168, 1988) usando anti-inmunoglobulinas específicas de especie, como anticuerpos para la precipitación.

35 La *capacidad de la unión* se calculó a continuación a partir de la cantidad de inmunoglobulina no unida presente en el ensayo y expresada como el porcentaje de la cantidad total añadida a la matriz en la materia prima.

El *rendimiento* se calculó como el porcentaje de inmunoglobulina añadida, encontrada en la fracción del material eluido.

40 La *pureza* de la inmunoglobulina eluida fue analizada con SDS-PAGE (electroforesis con poliacrilamida y dodecil-sulfato sódico) bajo condiciones reductoras, seguida de tinción de las bandas proteicas con azul brillante de Coomassie. (Gel prefabricado 4-20% de tris-glicina, 1 mm, n° de cat.: EC6025, elución durante 1 hora a 30 mA; tampón de elución de SDS y tris-glicina n° de cat.: LC2675; tampón de la muestra de tris-glicina, n° de cat.: LC2676; equipo de reactivos para la tinción con Coomassie LC6025, todos los productos químicos eran de Novex, EE.UU.)

45 El grado de pureza tal y como se expresaba en porcentaje de los contenidos totales de proteína, se determinó examinando y procesando la imagen del gel de poliacrilamida teñido con Coomassie y secado. Para este fin, empleamos el sistema de CREAM, disponible en Kem-En-Tec A/S, Dinamarca (n° de cat.: 6010+6050).

50 *Resultados*

Suero	Capacidad de ligación (%)	Rendimiento (%)	Pureza (5)
55 Cabra	60	50	60
Cerdo	60	60	70
Conejo	80	60	90
60 Caballo	60	40	80
Ser humano	70	60	75

65

## 9. Aislamiento de tripsinógeno y quimotripsinógeno del páncreas bovino con agarosa con ácido 2-mercapto-benzoico

El siguiente ejemplo ilustra el uso de la agarosa con ácido 2-mercapto-benzoico como matriz adecuada para aislar y purificar proteasas, p. ej., tripsina y quimotripsina del páncreas bovino.

*Extracto del páncreas:* Las dos proteasas se aislaron como proenzimas tripsinógeno y quimotripsinógeno a partir de un extracto de páncreas bovino, producido mediante extracción con ácido sulfúrico, tal y como describe M. Laskowski, Métodos en Enzimología, volumen II, págs. 9-10, 1955. Después de la extracción, la suspensión se ajustó a pH 2,5, añadiendo hidróxido sódico 2 M y se aclaró filtrando y centrifugando durante 30 min. a 4000 rpm. Justo antes de purificar, el extracto fue ajustado a pH 4,5 con NaOH 2 M y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, y se recogió el material sobrenadante.

*Matriz en fase sólida:* La agarosa con ácido 2-mercapto-benzoico se basaba en perlas de agarosa al 6% activadas con epiclorohidrina, de Hispanagar y se sintetizaron tal y como se ha descrito en los ejemplos 1 A y 1 E. La concentración del ligando se midió con dos métodos diferentes y se encontró que era 65  $\mu\text{mol/g}$  de matriz húmeda, pero drenada, tal y como se había determinado mediante un análisis elemental y 60  $\mu\text{mol/g}$ , tal y como se había determinado mediante valoración ácido-base de la parte inmovilizada de ácido benzoico del ligando.

La matriz en fase sólida fue sometida a ensayo para estudiar la eficacia de la unión a tripsina y a quimotripsina, según el procedimiento siguiente:

- 1) La matriz se lavó con agua en un embudo de vidrio sinterizado y finalmente se drenó. Se pesaron 2,5 gramos de la matriz en fase sólida húmeda, pero drenada en una columna (diámetro interior de 5 mm). La matriz se lavó con 10 ml del tampón (citrato sódico 10 mM pH 4,5), 50 ml del extracto se aplicaron a la columna. La matriz se lavó con 15 ml del tampón de lavado (citrato sódico 10 mM pH 4,5). La matriz se eluyó con 10 ml de tampón de elución (ácido bórico 50 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,7).
- 2) La pureza del material eluido se analizó con SDS-PAGE (electroforesis con poliacrilamida y dodecilsulfato sódico) bajo condiciones reductoras, seguido de tinción de las bandas de proteína con azul brillante de Coomassie. (Gel prefabricado 4-20% de tris-glicina, 1 mm, n° de cat.: EC6025, elución 1 hora a 30 mA; tampón de elución tris-glicina SDS, n° de cat.: LC2675; tampón de la muestra de tris-glicina, n° de cat.: LC2676; equipo de reactivos para la tinción con Coomassie, LC6025 todos los productos químicos eran de Novex, EE.UU.).

## Resultados

Cantidad total de proteína en el material eluido	65 mg
Tripsina en el material eluido	35%
Quimotripsina en el material eluido	20%

Como se puede observar en estos resultados, se encontró sorprendentemente que este tipo de ligando, es decir, ligandos aromáticos que comprenden un grupo ácido según la invención, representados en esta memoria por el ácido 2-mercapto-benzoico como el ligando específico, son capaces de unirse muy eficientemente a proteínas tales como proteasas, con valores de pH relativamente bajos y con una fuerza iónica relativamente alta (es decir, aproximadamente 0,25 de fuerza iónica).

## 10. Eficacia de la unión de seroalbúmina bovina a diferentes matrices en fase sólida

El ejemplo siguiente ilustra la eficacia de diferentes matrices en fase sólida en un ensayo convencional de la unión, para la seroalbúmina bovina.

*Fases sólidas:* Se produjo una gama seleccionada de matrices en fase sólida basándose en perlas de agarosa activadas con epiclorohidrina, de Hispanagar, tal y como se ha descrito en el ejemplo 1 A y 1 E. Los ligandos sometidos a ensayo se enumeran en la tabla a continuación.

*Solución de seroalbúmina bovina pH 4,0 (BSA pH 4,0):* La seroalbúmina bovina purificada (Biofac A/S, Dinamarca) se disolvió hasta tener una concentración final de 10 mg/ml en citrato sódico 20 mM pH 4,0 + cloruro sódico 0,2 M.

*Solución de seroalbúmina bovina pH 7,0 (BSA pH 7,0):* La seroalbúmina bovina purificada (Biofac A/S, Dinamarca) se disolvió hasta tener una concentración final de 10 mg/ml en citrato sódico 20 mM pH 7,0 + cloruro sódico 0,2 M.



## ES 2 332 893 T3

### Procedimiento

#### Ensayo convencional de unión de la albúmina

Las matrices en fase sólida se lavaron con 10 volúmenes de agua desmineralizada en un filtro con aspiración a vacío y se drenaron mediante aspiración suave durante 1 min. Dos muestras de 1,0 g de matriz drenada bajo aspiración, se pesaron a continuación en dos tubos de ensayo de 10 ml, seguido de la adición de 6,0 ml de BSA pH 4,0 al primer tubo de ensayo y de 6,0 ml de BSA pH 7,0 al segundo tubo de ensayo. Dos muestras de 1,0 g de perlas de agarosa lisas drenadas bajo aspiración y no derivatizadas, de Hispanagar, también se añadieron a los 6,0 ml de las dos soluciones de BSA como testigos negativos. Los tubos de ensayo se cerraron a continuación con un tapón y la suspensión se incubó en una mezcladora de rodillos durante 2 horas a temperatura ambiente (20-25°C). El tubo de ensayo se centrifugó a continuación durante 5 min., a 2000 rpm para sedimentar la matriz. El material sobrenadante se aisló después de la matriz en fase sólida, pipeteando en tubos de ensayo separados, evitando la transferencia de partículas de la matriz y se filtró a través de un filtro pequeño de 0,2  $\mu$ m, no adsorbente (Millipore, EE.UU.). A continuación, se realizó una determinación de la concentración de BSA no unida en el material sobrenadante, midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm en un espectrofotómetro.

La cantidad de BSA unida a las matrices se calculó a continuación según la siguiente fórmula:

$$\text{mg de BSA unido por g de matriz drenada bajo aspiración} = (1. (\text{DO del material sobrenadante del ensayo} / \text{DO del testigo})) \times 60$$

La precisión de este método es superior al +/- 5%.

### Resultados

La tabla proporciona la cantidad de BSA unida en mg, por gramo de matriz húmeda, pero drenada bajo aspiración, en función del ligando acoplado y del pH de la solución de BSA.

Ligando acoplado a la matriz en fase sólida	BSA pH 4,0	BSA pH 7,0
ácido 3-hidroxi-benzoico	22	0
ácido 4-hidroxi-benzoico	5	0
ácido 3,5-dihidroxi-benzoico	36	58
ácido 2,4-dihidroxi-benzoico	41	0
ácido 2-hidroxi-1-naftálico	58	0
ácido 3-amino-benzoico	56	0
ácido 2-amino-benzoico	51	0
ácido 4-amino-benzoico	59	0
ácido 3,9-di-amino-benzoico	9	0
ácido 5-amino-isoftálico	17	51
ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico	21	52
ácido p-cumárico	26	0
ácido 2-mercapto-benzoico	59	0
ácido 2-mercapto-nicotínico	30	0
ácido 5-mercapto-1-tetrazol-acético	26	0
ácido 3-amino-1,2,4-triazol-5-carboxílico	6	30

## REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar inmunoglobulinas a partir de una solución que contiene una o varias inmunoglobulinas,  
5 que comprende las siguientes operaciones:

a) poner en contacto la solución que contiene una o varias inmunoglobulinas que tiene un pH en el intervalo de 2,0 a 10,0, y un contenido total en sales correspondiente a una fuerza iónica de como máximo 2,0, con una matriz en fase sólida que comprende un esqueleto de la matriz funcionalizado que es portador de una pluralidad de grupos  
10 funcionales con la fórmula siguiente



15 en donde M designa el esqueleto de la matriz, SP1 designa un espaciador, L designa un ligando que comprende un resto aromático o heteroaromático, opcionalmente sustituidos con un monociclo o un biciclo, con la condición de que el peso molecular del ligando -L sea como máximo 500 Dalton,

20 en donde el resto aromático o heteroaromático o SP1 es portador de un grupo ácido, y en donde la concentración del ligando está en el intervalo de 10-120  $\mu\text{mol/ml}$  de matriz en fase sólida hidratada y sedimentada,

con la condición adicional de que se cumplan los criterios de (i) e (ii), o los criterios de (ii) e (iii):

25 (i) la matriz en fase sólida tiene una eficacia de la unión de al menos el 50%, cuando se somete a ensayo con un pH en el intervalo de 2,0 a 10,0 en el “*Ensayo convencional de la unión de inmunoglobulinas*” descrito en esta memoria, o

30 (ii) la matriz en fase sólida tiene una eficacia de la unión promedio de al menos 60%, para todas las inmunoglobulinas sometidas a ensayo en el “*Ensayo de la unión a una matriz de anticuerpos monoclonales*” cuando se somete a ensayo con un pH en el intervalo de 2,0 a 10,0, o

35 (iii) la estabilidad de la matriz en fase sólida en NaOH 1 M es de tal modo, que la incubación de la matriz en NaOH 1 M en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 7 días, reduce la eficacia de la unión, a un pH en el intervalo desde una unidad de pH inferior al valor de pH máximo de la unión, hasta una unidad de pH superior al valor de pH máximo de la unión, tal y como se determina en el “*Ensayo convencional de la unión de inmunoglobulinas*”, descrito en esta memoria, en menos del 25%, comparada con una matriz sin tratar correspondiente, o

40 de este modo al menos una parte de las inmunoglobulinas queda unida a la matriz en fase sólida; y

b) separar la matriz en fase sólida que tiene inmunoglobulinas unidas a la misma, de la solución; y

c) opcionalmente, lavar la matriz en fase sólida; y

45 d) poner en contacto la matriz en fase sólida con un eluyente para liberar una o varias de las inmunoglobulinas de la matriz en fase sólida.

2. Un método según la reivindicación 1, en donde L se selecciona entre radicales que tienen la siguiente fórmula:



55 en donde X designa -O-, -S- o -NH-; A designa un anillo o un sistema de anillos aromáticos o heteroaromáticos; y SUB designa unos o varios sustituyentes.

3. Un método según la reivindicación 2, en donde SUB comprende al menos un sustituyente con la siguiente fórmula:



65 en donde SP2 designa un segundo espaciador opcional y ACID designa un grupo ácido.

4. Un método según la reivindicación 3, en donde SP2 designa alquilenos- $\text{C}_{1-6}$ , alquilenilos- $\text{C}_{2-6}$ , o un enlace simple.

5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde A es un radical aromático seleccionado entre radicales de benceno y radicales de naftaleno.

6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde A es un resto heteroaromático seleccionado entre radicales heteroaromáticos monocíclicos seleccionados a partir de tiofeno, furano, pirano, pirrol, imidazol, pirazol, isotiazol, isoxazol, piridina, pirazina, pirimidina y radicales de piridazina; y radicales heteroaromáticos bicíclicos, tales como indol, purina, quinolina, benzofurano, bencimidazol, benzotiazol y radicales de benzoxazol.

7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde A se selecciona entre radicales de piridina, radicales de bencimidazol, benzo-tiazol y benzoxazol.

8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el grupo ácido se selecciona entre un grupo de ácido carboxílico (-COOH), un grupo de ácido sulfónico (-SO<sub>2</sub>OH), un grupo de ácido sulfínico (-S(O)OH), un grupo de ácido fosfínico (-PH(O)(OH)), grupos monoésteres de ácido fosfónico (-P(O)(OH)(OR)), y un grupo de ácido fosfónico (-P(O)(OH)<sub>2</sub>).

9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde L es un grupo aromático o heteroaromático (radical) con los tipos siguientes como grupos funcionales: ácidos benzoicos, tales como ácidos 2-aminobenzoicos, ácidos 3-aminobenzoicos, ácidos 4-aminobenzoicos, ácidos 2-mercaptobenzoicos, ácido 4-amino-2-clorobenzoico, ácido 2-amino-5-clorobenzoico, ácido 2-amino-4-clorobenzoico, ácidos 4-aminosalicílicos, ácidos 6-aminosalicílicos, ácidos 3,4-diaminobenzoicos, ácido 3,5-diaminobenzoico, ácido 5-aminoisoftálico, ácido 4-aminoftálico; ácidos cinámicos, tales como ácidos hidroxí-cinnámicos; ácidos nicotínicos, tales como ácidos 2-mercaptónicotínicos; ácidos naftoicos, tales como ácido 2- hidroxí-1-naftoico; quinolinas, tales como 2-mercaptoquinolina; ácidos tetrazolacéticos, tales como ácido 5-mercapto-1-tetrazolacético; tiadiazoles, tales como 2-mercapto-5-metil-1,3,4-tiadiazol; bencimidazoles, tales como 2-amino-bencimidazol, 2-mercaptobencimidazol y 2-mercapto-5-nitro-bencimidazol; benzotiazoles, tales como 2-aminobenzotiazol, 2-amino-6-nitrobenzotiazol, 2-mercaptobenzotiazol y 2-mercapto-6-etoxibenzotiazol; benzoxazoles, tales como 2-mercaptobenzoxazol; tiofenoles, tales como tiofenol y 2-aminotiofenol; ácido 2-(4-aminofeniltio)acético; ácidos sulfónicos y ácidos fosfónicos aromáticos o heteroaromáticos, tales como ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico y fenoles, tales como 2-amino-4-nitrofenol.

10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el contenido total en sales de la solución que contiene las inmunoglobulinas, se corresponde con una fuerza iónica en el intervalo de 0,05 a 2,0.

11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución que contiene las inmunoglobulinas comprende sales liotrópicas en una concentración de como máximo 0,4 M.

12. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el eluyente empleado (operación (d)) comprende menos de 10% (v/v) de disolventes orgánicos.

13. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el lavado de la fase sólida (operación (c)) comprende lavar con solución acuosa que comprende un detergente cargado negativamente.

14. Un método según la reivindicación 13, en donde el lavado de la matriz en fase sólida (operación (c)) comprende lavar con un tampón de sales inorgánicas u orgánicas que comprende un detergente cargado negativamente.

15. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución que contiene las inmunoglobulinas comprende un detergente cargado negativamente.

16. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde SP1 designa un espaciador que comprende un grupo ácido.

17. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución que contiene una o varias inmunoglobulinas tiene un pH en el intervalo de pH 3-7.

18. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el peso molecular del brazo ligando-espaciador (SP1-L) es como máximo 300 Dalton.

19. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde A es un radical aromático seleccionado entre el grupo consistente en un radical benceno, tal como fenilo, 1,2-fenileno, 1,3-fenileno, 1,4-fenileno, 1,2,3-benzotriilo, 1,2,4-benzotriilo, 1,3,5-benzotriilo, 1,2,3,4-benzotetrailo, 1,2,3,5-benzotetrailo, 1,2,4,6-benzotetrailo y 1,2,3,4,5-benzopentailo.

20. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde L se selecciona entre el grupo consistente en ácidos aminobenzoicos, tales como ácido 2-amino-benzoico; ácido 2-mercapto-benzoico; ácido 3-amino-benzoico, ácido 4-amino-benzoico; ácido 4-amino-2-clorobenzoico; ácido 2-amino-5-clorobenzoico; ácido 2-amino-4-clorobenzoico; ácidos 4-aminosalicílicos; ácidos 5-aminosalicílicos; ácidos 3,4-diaminobenzoicos; ácido 3,5-diaminobenzoico; ácido 5-aminoisoftálico; y ácido 4-aminoftálico.

## ES 2 332 893 T3

21. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde L se obtiene a partir del grupo de compuestos heteroaromáticos que comprenden un ácido carboxílico y un grupo amino como sustituyente, tal como ácido 2-amino-nicotínico, ácido 2-mercapto-nicotínico, ácido 6-amino-nicotínico o ácido 2-amino-4-hidroxipirimidin-carboxílico.

22. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el grupo ácido tiene un valor de  $pK_a$  en el intervalo de 1,0-6,0.

23. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el espaciador SP1 se selecciona entre birradicales alifáticos de cadena corta, de fórmula  $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$  (obtenido a partir de epiclorohidrina),  $-(CH_2)_3-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-$  (obtenido a partir de éter glicidílico de alilo) o  $-CH_2-CH(OH)-CH_2-O-(CH_2)_4-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-$  (obtenido a partir de éter diglicidílico de butanodiol).