

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 578**

51 Int. Cl.:

C07K 14/31 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2010 E 10817707 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2478005**

54 Título: **Cristales y cristales reticulados de Proteína A y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

15.09.2009 US 242537 P

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

03.03.2015

73 Titular/es:

SHENOY, BHAMI (16.7%)
625 Putnam Avenue
Cambridge, MA 02139-4807, US;
PATEL, REENA (16.7%);
BALADI, SIBYL (16.7%);
MCGRATH, MARGARET (16.7%);
KHALAF, NAZER (16.7%) y
RANDHAWA, CHANCHAL (16.7%)

72 Inventor/es:

SHENOY, BHAMI;
PATEL, REENA;
BALADI, SIBYL;
MCGRATH, MARGARET;
KHALAF, NAZAR y
RANDHAWA, CHANCHAI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 530 578 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cristales y cristales reticulados de Proteína A y métodos de uso de los mismos

ANTECEDENTES

5 La Proteína A es una proteína de superficie de 40-60 kDa encontrada originalmente en la pared celular de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Ha encontrado uso en investigación bioquímica debido a su capacidad para unirse a inmunoglobulinas. La Proteína A se une a proteínas de muchas especies de mamíferos, muy especialmente IgGs. Se une con la región Fc de inmunoglobulinas a través de la interacción con la cadena pesada. La Proteína A estafilocócica recombinante se produce a menudo en *E. coli* para uso en inmunología y otra investigación biológica.

10 La Proteína A está acoplada a menudo a otras moléculas, tales como colorante fluorescente, enzimas, biotina, oro coloidal o yodo radioactivo, sin afectar al sitio de unión al anticuerpo. También se utiliza ampliamente acoplado a perlas magnéticas, de látex y de agarosa. La Proteína A está a menudo inmovilizada sobre un soporte sólido, y se usa como un método fiable para purificar IgG total a partir de mezclas proteicas brutas tales como suero o fluido ascítico, o se acopla con uno de los marcadores anteriores para detectar la presencia de anticuerpos. Los estudios de inmunoprecipitación con Proteína A conjugada a perlas también se usan habitualmente para purificar proteínas o complejos proteicos indirectamente a través de anticuerpos frente a la proteína o complejo proteico de interés.

15 Además, se usa ampliamente en la purificación de anticuerpos monoclonales procedentes de una amplia variedad de fuentes.

20 El documento WO 97/36614 describe polímeros y conjugados poliméricos que comprenden Proteína A estafilocócica reticulada, o conjugado reticulado de superantígeno con Proteína A, o derivados funcionales reticulados de los mismos, que oscilan en tamaño de 12 kDa a 10.000 kDa, que son útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide e ITP así como enfermedades neoplásicas. Se describen composiciones que comprenden polímeros químicamente reticulados de Proteína A sola o Proteína A y antitoxinas bacterianas, opcionalmente complejados además con inmunoglobulinas y componentes del complemento, así como métodos para obtener y usar estas composiciones en el tratamiento de enfermedades.

25 En el documento US 5619710 A se presenta una proteína (tal como una enzima o anticuerpo) inmovilizada reticulando cristales de la proteína con un agente de reticulación multifuncional. Los cristales de proteína reticulados se pueden liofilizar para el almacenamiento. Una proteína preferida es una enzima tal como termolisina, elastasa, asparaginasa, lisozima, lipasa o ureasa. Los cristales reticulados de enzima o anticuerpo se pueden usar en un ensayo, kit de diagnóstico o biosensor para detectar un analito, en un dispositivo extracorpóreo para alterar un componente de un fluido y en la producción de un producto tal como usando cristales de termolisina reticulados.

30

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

35 La invención se refiere, en parte, a la preparación de cristales de proteína reticulados de Proteína A (CLPCs), producidos por ejemplo para desarrollar un sistema de Proteína A innovador (por ejemplo, sistema cromatográfico) para la purificación de anticuerpos. Los CLPCs de Proteína A ofrecen la ventaja de actividad de Proteína A muy concentrada combinada con estabilidad elevada y resistencia química. La concentración de Proteína A condensada reduce el tamaño de la columna (si se usa), el volumen de tampón y el tiempo de procedimiento. Además, la reticulación de cristales de Proteína A puede evitar o disminuir la lixiviación de la Proteína A durante la purificación (por ejemplo, usando cromatografía), por ejemplo, de inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos). En conjunto, esto puede reducir el tiempo y coste de producción de los anticuerpos.

40 La invención se refiere a formas cristalinas reticuladas de Proteína A ("CLPC de Proteína A o CLPC") o sus derivados y a sus usos para purificar inmunoglobulinas/anticuerpos o fragmentos Fab o Fc correspondientes, por ejemplo anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales de cultivo celular, anticuerpos terapéuticos, anticuerpos de cultivo bacteriano, suero, plasma, al uso de tales cristales de Proteína A para la inmunoprecipitación, y dispositivos extracorpóreos.

45 Se describen aquí composiciones que contienen una forma cristalina reticulada (CLPC) de Proteína A. En una realización, los cristales de Proteína A están reticulados con glutaraldehído. En algunas realizaciones, el cristal de Proteína A está reticulado con alrededor de 0,02% a alrededor de 4% (p/v) de glutaraldehído. En todavía otras realizaciones, el cristal de Proteína A está reticulado con alrededor de 1,00% (p/v) de glutaraldehído.

50 Las composiciones descritas aquí son más activas que las formas no cristalinas de Proteína A, debido a que tienen una mayor capacidad de unión. En una realización de esto, la capacidad de unión de las formas cristalinas reticuladas de Proteína A es al menos alrededor de 100% mayor que la capacidad de unión de la forma inmovilizada soluble a pH 7. En todavía otra realización, el cristal de Proteína A reticulado tiene al menos alrededor de 150% de la capacidad de unión de la forma inmovilizada no cristalina de Proteína A.

55 En una realización de la invención, los cristales de Proteína A de la invención son estables (retienen su capacidad de unión) a alrededor de pH 2 a alrededor de pH 12.

En otra realización, los cristales de Proteína A descritos aquí tienen 0,0% de lixiviación de proteína cuando se

comparan con Proteína A no cristalina inmovilizada.

También se describe aquí el uso reticulado de las composiciones de Proteína A cristalina en una columna preempaquetada como material de columna, o en una membrana (impregnada), o en un dispositivo extracorpóreo.

5 En todavía otra realización de la invención, se describen aquí kits que contienen las composiciones de Proteína A cristalina reticulada descritas aquí. Tales kits pueden contener otros reactivos, aparato de purificación, e instrucciones para usar las composiciones de Proteína A cristalina reticulada descritas aquí.

10 En una realización, la Proteína A cristalina reticulada se puede preempaquetar en una columna a usar como un material de purificación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, por ejemplo purificación de anticuerpos monoclonales a partir de cultivo de células de mamíferos, purificación de anticuerpos monoclonales expresados en leche transgénica, o anticuerpos policlonales generados en suero.

Adicionalmente, se describen métodos para producir cristales de proteína reticulados a partir de Proteína A soluble recombinante. También se describen composiciones, por ejemplo composiciones farmacéuticas, que incluyen los cristales reticulados de Proteína A ("CLPC").

15 Según la invención, se proporcionan cristales de Proteína A reticulados. El agente reticulante puede ser multifuncional y, en ciertas realizaciones, el agente es un agente bifuncional, tal como glutaraldehído. En ciertas realizaciones, los cristales de Proteína A se reticulan con glutaraldehído a una concentración que no altera esencialmente la capacidad de unión, por ejemplo a una concentración de al menos alrededor de 0,02% (p/v). En algunas realizaciones, el nivel de reticulación del cristal de Proteína A es equivalente al producido mediante tratamiento con 0,02% (p/v) de glutaraldehído. El nivel de reticulación se puede determinar mediante métodos
20 conocidos en la técnica o descritos en este documento, por ejemplo determinando el nivel de lixiviación de la proteínas.

La invención también proporciona cristales de Proteína A, por ejemplo cristales de Proteína A que tienen una mayor capacidad de unión, por ejemplo al menos alrededor de 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más, en comparación con la Proteína A soluble.

25 La invención proporciona además un cristal de Proteína A reticulado estabilizado, en el que dicho cristal estabilizado retiene una capacidad de unión y/o estabilidad, en condiciones ácidas, al menos 2 a 3 veces mayor que la capacidad de unión y/o estabilidad retenida por una Proteína A en condiciones ácidas similares (por ejemplo, un pH ácido de alrededor de 2 a 3). En algunas realizaciones, el cristal de Proteína A estabilizado tiene al menos alrededor de 200%, 300%, 400% o más capacidad de unión y/o estabilidad que una Proteína A soluble en condiciones ácidas.

30 La invención proporciona además un cristal de Proteína A reticulado estabilizado, en el que dicho cristal estabilizado retiene una capacidad de unión y/o estabilidad, en presencia de una proteasa, al menos 2 a 3 veces mayor que la capacidad de unión y/o estabilidad retenida por una Proteína A soluble en condiciones similares. En algunas realizaciones, el cristal de Proteína A estabilizado tiene al menos alrededor de 200%, 300%, 400% o más capacidad de unión y/o estabilidad que una Proteína A soluble en presencia de una proteasa. La proteasa se puede escoger, por ejemplo, de una o más de, por ejemplo, pepsina, quimotripsina o pancreatina.
35

En algunas realizaciones, la capacidad de unión de la Proteína A estabilizada o soluble se mide después de exponer el cristal estabilizado o la Proteína A soluble a condiciones ácidas y/o a una proteasa durante un tiempo predeterminado, por ejemplo al menos una, dos, tres, cuatro o cinco horas.

40 En un aspecto relacionado, la invención se refiere a un cristal de Proteína A reticulado que es sustancialmente estable en condiciones variables de pH (por ejemplo, alrededor de pH 2,0 ó 3 a alrededor de pH 7,5 o alrededor de pH 8,5 a alrededor de pH 10-14), y/o en presencia de una proteasa, por ejemplo una proteasa que se puede escoger de una o más de las siguientes: pepsina, quimiotripsina o pancreatina. En todavía otras realizaciones, el cristal reticulado retiene su capacidad de unión al menos alrededor de 2 a 3 veces mayor que la capacidad de unión retenida por una Proteína A soluble en condiciones ácidas (por ejemplo, un pH ácido de alrededor de 2 a 3) y en presencia de una proteasa, como se describe aquí. En otras realizaciones, el cristal de Proteína A estabilizado es al menos 200%, 300%, 400% o más estable que una Proteína A soluble en condiciones ácidas (por ejemplo, un pH ácido de alrededor de 2 a 3) y en presencia de una proteasa, como se describe aquí.
45

También se describen aquí composiciones, por ejemplo composiciones farmacéuticas, que incluyen los cristales de Proteína A reticulados.

50 En algunas realizaciones, los cristales reticulados incluyen Proteína A que tiene una secuencia idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia de la Proteína A encontrada en una fuente natural, tal como *Staphylococcus aureus* o cepas relacionadas. En otras realizaciones, la Proteína A se produce por medios recombinantes.

55 En otro aspecto, la invención proporciona membranas impregnadas con cristales de proteína reticulados, dispositivos, sistemas y métodos para producir y usar los mismos para una variedad de aplicaciones adecuadas, incluyendo, por ejemplo, la purificación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos y la eliminación de

inmunoglobulinas durante la terapia de diálisis. A este respecto, las membranas de la presente invención impregnadas con Proteína A se pueden unir a los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Esto puede minimizar eficazmente la cantidad de tampón necesaria para la purificación, minimizando así los costes.

5 En otra realización, la presente invención proporciona un material que incluye una membrana impregnada con alrededor de $3,25 \text{ mg/cm}^2$ o menos de un cristal de proteína reticulado. Preferiblemente, las membranas están impregnadas con cristales de Proteína A reticulados ("CLPC de Proteína A"). Las membranas impregnadas con CLPCs de Proteína A se pueden usar para aislar y purificar inmunoglobulinas, y se pueden reusar de forma similar a la Proteína A inmovilizada.

10 En todavía otra realización, la presente invención proporciona un método para producir una membrana impregnada con cristales de proteína reticulados, preferiblemente CLPC de Proteína A. El método incluye preparar una disolución de moldeo de membrana. La disolución de moldeo incluye un material base polimérico, tal como poliuretano, en un disolvente, tal como 1-metil-2-pirrolidiona ("NMP"), dimetilformamida ("DMF"), y similar, o sus combinaciones. La disolución de moldeo de membrana también puede incluir un agente para dar volumen, tal como óxido de circonio, y un agente, tal como polivinilpirrolidona ("PVP"), para hacer a la membrana más hidrófila.

15 La disolución de moldeo se mezcla entonces con una cantidad adecuada de CLPC de Proteína A, de manera que la membrana se impregna con alrededor de $3,25 \text{ mg/cm}^2$ de CLPC de Proteína A. La disolución se puede extender entonces sobre un material soporte, tal como un material de malla sintético, y se puede sumergir en un medio acuoso en condiciones adecuadas, formando así un precipitado de membrana. El precipitado de membrana se seca subsiguientemente en una disolución de glicerol, preferiblemente una mezcla de glicerol y agua en una relación de
20 40:60.

Una ventaja de la presente invención es proporcionar membranas mejoradas impregnadas con proteína adecuadas para uso en una variedad de diferentes aplicaciones, tales como la purificación e inmunoprecipitación de anticuerpos.

25 Una ventaja adicional de la presente invención es proporcionar materiales mejorados capaces de unirse a anticuerpos sin la necesidad de ningún soporte inerte, a diferencia de la Proteína A inmovilizada.

En todavía otro aspecto, la composición de la invención se puede usar en una terapia para reducir la concentración de inmunoglobulina (trastorno asociado con concentración elevada de inmunoglobulina) en un sujeto al administrar una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que incluye cristales de Proteína A reticulados, como se describe aquí. En una realización de este aspecto, los cristales de Proteína A se estabilizan mediante un agente de reticulación, tal como glutaraldehído. La administración de la composición puede producir una reducción de la
30 concentración de inmunoglobulina de al menos alrededor de 10%, al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 30%, o al menos alrededor de 40% o más. En algunas realizaciones, la composición se administra vía oral o a través de un dispositivo extracorpóreo. En una realización adicional, el dispositivo extracorpóreo es un catéter, por ejemplo un catéter revestido con cristales de Proteína A reticulados. En todavía otra realización, el método para
35 reducir la concentración de inmunoglobulina en un mamífero incluye una etapa de analizar la concentración de inmunoglobulina en una muestra biológica del mamífero, tal como una muestra de sangre, plasma o suero.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que incluye Proteína A reticulada (por ejemplo, los cristales reticulados, como se describe aquí).

40 En todavía otro aspecto, la composición de la invención se puede usar en una terapia para tratar un mamífero administrando, como un sorbente en un equipo de diálisis (dispositivo extracorpóreo), una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que incluye cristales de Proteína A reticulados (por ejemplo, los cristales reticulados, como se describe aquí).

45 En todavía otra realización, la etapa de cristalización incluye concentrar la proteína purificada, seguido de la adición de reactivos de precipitación, formando así proteína cristalizada. La etapa de cristalización incluye adicionalmente poner en contacto la proteína cristalizada con un agente de reticulación, por ejemplo un agente de reticulación descrito aquí (por ejemplo, glutaraldehído). La concentración de agente de reticulación a usar puede estar en el intervalo de alrededor de 0,01% a 20% p/v; típicamente, alrededor de 0,02% a 10% p/v; más típicamente, alrededor de 0,02%, 0,5% o 1% p/v.

50 En otras realizaciones, el rendimiento de la proteína cristalizada en la preparación es al menos alrededor de 50%, 60%, 70%, 80% de la proteína específica hallada en la suspensión de Proteína A soluble. En otras realizaciones, el rendimiento de la proteína cristalizada es al menos alrededor de 90%, 95% o más del encontrado en la preparación soluble. En todavía otras realizaciones, el rendimiento de la proteína cristalizada es al menos alrededor de 50%, 60%, 70%, 80% del encontrado en la preparación soluble.

55 La invención proporciona además cristales de proteína reticulados (por ejemplo, cristales de Proteína A reticulados) producidos mediante los métodos descritos aquí.

En algunos aspectos, la descripción presenta cristales de proteína reticulados (CLPCs) de Proteína A, por ejemplo

reticulados como se describe aquí.

En algunos aspectos, la descripción presenta una composición que contiene cristales de proteína reticulados (CLPCs) de Proteína A y otro ingrediente (por ejemplo, tampón, por ejemplo tampón Tris).

5 En algunos aspectos, la descripción presenta un método para obtener cristales de proteína reticulados (CLPCs) de Proteína A, por ejemplo, como se describe aquí.

En algunos aspectos, la descripción presenta un kit que contiene cristales de proteína reticulados (CLPCs) de Proteína A y otro componente (por ejemplo, instrucciones para uso).

10 En algunos aspectos, la descripción presenta un método para usar cristales de proteína reticulados (CLPCs) de Proteína A, por ejemplo como se describe aquí, por ejemplo para purificar una inmunoglobulina, por ejemplo un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo terapéutico. En algunas realizaciones, la lixiviación de la Proteína A se evita o disminuye (por ejemplo, se disminuye en alrededor de 10%, alrededor de 20%, alrededor de 30%, alrededor de 40%, alrededor de 50%, alrededor de 60%, alrededor de 70%, alrededor de 80%, alrededor de 90%, alrededor de 100% o alrededor de 2 veces, alrededor de 5 veces, o alrededor de 10 veces, en comparación con la cantidad de lixiviación cuando se usa en las mismas condiciones Proteína A en forma no cristalina o cuando se usan en las mismas condiciones cristales de Proteína A en forma no reticulada.

20 En algunos aspectos, la descripción presenta un método para usar cristales de proteína reticulados (CLPCs) de Proteína A, por ejemplo como se describe aquí, por ejemplo para purificar una inmunoglobulina, por ejemplo un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo terapéutico. En algunas realizaciones, se incrementa la capacidad de unión de la Proteína A (por ejemplo, se incrementa en alrededor de 10%, alrededor de 20%, alrededor de 30%, alrededor de 40%, alrededor de 50%, alrededor de 60%, alrededor de 70%, alrededor de 80%, alrededor de 90%, alrededor de 100%, o más, o alrededor de 2 veces, alrededor de 5 veces, o alrededor de 10 veces, o más, en comparación con la cantidad de unión cuando se usa en las mismas condiciones inmovilizadas (usando un soporte) Proteína A en forma no cristalina o cuando se usan en las mismas condiciones inmovilizadas (usando un soporte) cristales de Proteína A en forma no reticulada.

25 En algunos aspectos, la descripción presenta una columna (por ejemplo, columna de cromatografía) que contiene cristales de proteína reticulados (CLPCs) de Proteína A.

En algunos aspectos, la descripción presenta una membrana (por ejemplo, sistema de holofibra) que contiene cristales de proteína reticulados (CLPCs) de Proteína A.

30 Se describen aquí métodos para cristalizar Proteína A, en los que la Proteína A se solubiliza o concentra, y a la proteína solubilizada o concentrada se añaden reactivos de precipitación para formar cristales.

35 Se describen aquí procedimientos para la purificación de inmunoglobulinas, que incluyen las etapas de (a) mezclar un medio que contiene inmunoglobulinas con una disolución tampón que tiene un pH en el intervalo de alrededor de pH 7,0 a pH 10 y que contiene una combinación de cationes y aniones para proporcionar un medio inmunoglobulínico tamponado; (b) poner en contacto dicho medio inmunoglobulínico tamponado con un adsorbente de Proteína A reticulada y cristalina inmovilizada (CLPC de Proteína A: la proteína A se inmoviliza cristalizando y reticulando moléculas de Proteína A) para adsorber las inmunoglobulinas presentes en dicho medio inmunoglobulínico tamponado con dicho adsorbente de Proteína A reticulada y cristalina inmovilizada; (c) lavar el adsorbente de CLPC de Proteína A que tiene inmunoglobulinas adsorbidas en él con dicha disolución tampón; (d) poner en contacto dicho adsorbente de CLPC de Proteína A que tiene inmunoglobulinas adsorbidas en él con una disolución tampón que tiene un pH en el intervalo de alrededor de pH 2 a pH 6 para eliminar las inmunoglobulinas adsorbidas del adsorbente de CLPC de Proteína A; y (e) recuperar en forma sustancialmente pura las inmunoglobulinas eliminadas. En una realización adicional de este procedimiento, el procedimiento se logra en una columna que contiene las composiciones cristalinas de Proteína A descritas aquí. En todavía otra realización del procedimiento, la puesta en contacto del medio inmunoglobulínico tamponado con el adsorbente de CLPC de Proteína A se logra en una columna que contiene adsorbente de CLPC de Proteína A. En otra realización de este procedimiento, el medio que contiene inmunoglobulinas es un suero de mamífero normal, o suero de mamífero inmunitario, tal como plasma o fluido ascítico. En otras realizaciones, el medio inmunoglobulínico se obtiene de un hibridoma, fluido de cultivo tisular, fluido de cultivo celular, fluido de cultivo de células de mamífero, fluido de cultivo de células bacterianas, fluido de fuente transgénica, un extracto vegetal, o un fluido de cultivo de levaduras.

50 En algunas realizaciones del procedimiento para la purificación, la disolución tampón tendrá un pH en el intervalo de alrededor de pH 7,0 a alrededor de pH 10, y el tampón es un tampón de glicina, tampón de borato, tampón de tris(hidroximetil)aminometano, o tampón de fosfato. En todavía otras realizaciones del procedimiento de purificación, la disolución tampón tiene un intervalo de concentraciones de alrededor de 0,01 M a alrededor de 0,25 M, o alrededor de 0,05 M a alrededor de 0,5 M.

55 En todavía otras realizaciones del procedimiento para purificación, la disolución tampón tiene un pH en el intervalo de alrededor de pH 2 a alrededor de pH 6, y tiene una concentración en el intervalo de alrededor de 0,01 M a 0,25 M. En algunas realizaciones del procedimiento de purificación, la disolución tampón es un tampón de ácido acético-

acetato, y tiene un pH en el intervalo de alrededor de pH 2 a alrededor de pH 6.

En otra realización del procedimiento para purificación, la disolución tampón contiene iones potasio e iones fosfato en una concentración de alrededor de 1,0 M a alrededor de 1,5 M.

5 En todavía otra realización del procedimiento para purificación, la disolución tampón contiene iones amonio e iones fosfato en una concentración de alrededor de 1,0 M a alrededor de 1,5 M. En todavía otra realización del procedimiento para purificación, la disolución tampón contiene iones amonio e iones sulfato en una concentración de alrededor de 1,0 M a alrededor de 1,5 M. En algunas realizaciones del procedimiento para purificación, la disolución tampón contiene iones sodio e iones sulfato en una concentración de alrededor de 1,0 M a alrededor de 1,25 M. En todavía otras realizaciones, la disolución tampón contiene iones sodio, iones fosfato e iones cloruro en una
10 concentración de alrededor de 1,0 M a alrededor de 1,25 M.

En realizaciones adicionales de este procedimiento para purificación, el adsorbente de Proteína A cristalina y reticulada inmovilizada se lleva a cabo sin ningún soporte. En todavía otras realizaciones, el adsorbente es Proteína A cristalina y reticulada sin ningún soporte unido a perlas magnéticas.

15 Se describe aquí un método (no reivindicado) para purificar una proteína a partir de una disolución contaminada usando cromatografía de Proteína A, que incluye las etapas de: (a) adsorber la proteína a purificar a una Proteína A cristalizada y reticulada en fase sólida inmovilizada; (b) eliminar contaminantes unidos a la fase sólida lavando la fase sólida con un disolvente electrolítico que tiene un pH en el intervalo de alrededor de 5 a alrededor de 7 y que contiene un electrolito seleccionado del grupo que consiste en cloruro de tetrametilamonio (TMAC), cloruro de tetraetilamonio (TEAC), cloruro de tetrapropilamonio y cloruro de tetrabutilamonio; y (c) recuperar la proteína del
20 sólido. En algunas realizaciones de este método, la proteína a purificar es una inmunoglobulina, anticuerpo, o fragmento del mismo. En todavía otras realizaciones de este método, la proteína a purificar es un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, o anticuerpo quimérico, o fragmento del mismo. En otras realizaciones de este método, la fase sólida es una Proteína A reticulada cristalina en una columna.

25 El método anterior (no reivindicado) para purificar una proteína de una disolución contaminada, el disolvente electrolítico contiene cloruro de tetrametilamonio (TMAC) o cloruro de tetraetilamonio (TEAC). La concentración del electrolito en el disolvente electrolítico está en el intervalo de alrededor de 0,1 a alrededor de 1,0 M, o en el intervalo de alrededor de 0,25 a alrededor de 0,5 M.

30 El método anterior (no reivindicado) para purificar una proteína de una disolución contaminada, los contaminantes son proteínas de ovario de hámster chino (CHOP). Este método, la disolución contaminada comprende fluido de cultivo de células cosechadas (HCCF) que comprende un anticuerpo recombinante.

El método anterior (no reivindicado) para purificar una proteína de una disolución contaminada, el tampón de elución de la etapa (c) implica eluir la proteína usando un tampón de elución que tiene un pH en el intervalo de alrededor de 2,0 a alrededor de 5,0, o de alrededor de 2,5 a alrededor de 3,5.

35 Se describe aquí un método (no reivindicado) para purificar una proteína que se ha producido mediante una célula de ovario de hámster chino (CHO) usando cromatografía de Proteína A, que incluye las etapas de: (a) adsorber la proteína a Proteína A inmovilizada, que se obtiene cristalizando y reticulando Proteína A para crear una fase sólida; (b) eliminar los contaminantes de proteína de ovario de hámster chino (CHOP) unidos a la fase sólida lavando la fase sólida con un disolvente electrolítico que comprende un electrolito seleccionado del grupo que consiste en cloruro de tetrametilamonio (TMAC), cloruro de tetraetilamonio (TEAC), cloruro de tetrapropilamonio y cloruro de tetrabutilamonio; y (c) recuperar la proteína de la fase sólida.
40

45 También se describe aquí un método (no reivindicado) para purificar una proteína que se ha producido mediante una célula de ovario de hámster chino (CHO) usando cromatografía de Proteína A, que incluye las etapas de: (a) adsorber la proteína a Proteína A inmovilizada, que se obtiene cristalizando y reticulando para crear una fase sólida; (b) eliminar los contaminantes de proteína de ovario de hámster chino (CHOP) unidos a la fase sólida lavando la fase sólida con un disolvente electrolítico que tiene un pH en el intervalo de alrededor de 5 a alrededor de 7 y que contiene un disolvente electrolítico seleccionado del grupo que consiste en cloruro de tetrametilamonio (TMAC), cloruro de tetraetilamonio (TEAC), cloruro de tetrapropilamonio y cloruro de tetrabutilamonio, en el que la concentración del electrolito en el disolvente electrolítico está en el intervalo de alrededor de 0,25 a alrededor de 0,5 M; y (c) recuperar la proteína de la fase sólida.

50 Se describe aquí una composición para uso en el tratamiento de un trastorno asociado con concentración elevada de globulinas inmunitarias en un mamífero, que comprende administrar cristales de Proteína A reticulados al mamífero en una cantidad suficiente para reducir uno o más síntomas asociados con el trastorno. En algunas realizaciones de este método, el trastorno está relacionado con la función inmunitaria.

55 Se describe aquí un método (no reivindicado) para producir una membrana, el método incluye las etapas de: (a) preparar una disolución de moldeo compuesta de un material base polimérico en un disolvente; (b) añadir una cantidad suficiente de un cristal de proteína reticulada a la disolución de moldeo; (c) aplicar la disolución de moldeo de la membrana a un material soporte; (d) sumergir la disolución de moldeo de la membrana y el material soporte en

- un medio acuoso; (e) formar un material compuesto de membrana; (f) y secar el material compuesto de membrana con un medio fluido. En algunas realizaciones de este método, el material base polimérico está compuesto de un polímero adecuado, incluyendo poliuretano. En todavía otras realizaciones de este método, el cristal de proteína reticulado incluye una proteína seleccionada del grupo que consiste en Proteína A, Proteína G, Proteína L, y sus combinaciones. En todavía otras realizaciones de este método, el disolvente se selecciona del grupo que consiste en 1-metil-2-pirrolidinona, dimetilformamida, y sus combinaciones. En algunas realizaciones de este método, el medio fluido incluye glicerol.
- Se describe un método (no reivindicado) para producir una membrana impregnada con Proteína A, que incluye las etapas de: (a) formar una disolución de moldeo de la membrana que incluye poliuretano y un agente de volumen en un disolvente; (b) añadir la CLPC de Proteína A a la disolución de moldeo de la membrana; (c) procesar la disolución de moldeo de la membrana en un medio acuoso; (d) y formar un precipitado de membrana impregnado con el CLPC de Proteína A. En algunas realizaciones de este método, el agente para dar volumen se selecciona del grupo que consiste en óxido de circonio, fosfato de circonio, carbono, y sus combinaciones. En otra realización, el método para producir una membrana impregnada incluye la etapa adicional de secar el precipitado de membrana con una disolución de glicerol.
- Se describe aquí un material que resulta de una composición capaz de eliminar inmunoglobulinas de dializados o fluidos corporales durante terapia de diálisis, incluyendo el material una membrana impregnada con cristal de Proteína A reticulado, en el que la membrana se ha secado con un medio fluido. En una realización, el cristal de Proteína A reticulado puede incluir además una proteína seleccionada del grupo que consiste en Proteína G, Proteína L, y sus combinaciones. En todavía otras realizaciones, la membrana incluye un agente para dar volumen, seleccionado del grupo que consiste en óxido de circonio, fosfato de circonio, carbono, y sus combinaciones. El medio fluido puede incluir glicerol.
- Se describe aquí un dispositivo (no reivindicado) para eliminar inmunoglobulinas de un dializado o fluido corporal usado durante terapia de diálisis, en el que el dispositivo incluye: un cuerpo que define un interior con una entrada y una salida, conteniendo el interior una capa de una membrana impregnada con un cristal de proteína reticulado, en el que la membrana se ha secado con un medio fluido. En algunas realizaciones de este dispositivo, el cristal de proteína reticulado incluye una proteína seleccionada del grupo que consiste en Proteína A, Proteína G, Proteína L, y sus combinaciones. En otras realizaciones de este dispositivo, el medio fluido incluye glicerol.
- Se describe aquí un sistema (no reivindicado) para proporcionar terapia de diálisis, comprendiendo el sistema un dispositivo capaz de eliminar inmunoglobulinas durante la diálisis, en el que el dispositivo incluye un cuerpo que define un interior con una entrada y una salida, y el interior contiene una capa de una membrana impregnada con cristal de proteína reticulado, en el que la membrana se ha secado con un medio fluido. En realizaciones de este sistema, el cristal de proteína reticulado incluye una proteína seleccionada del grupo que consiste en Proteína A, Proteína G, Proteína L, y sus combinaciones. En otras realizaciones, el medio fluido incluye glicerol.
- Se describe aquí la composición para uso en terapia de diálisis, que incluye: (a) hacer pasar un fluido de diálisis o fluido corporal a través de un dispositivo que incluye una capa de una membrana impregnada con cristal de proteína reticulado, en el que la membrana se ha secado con una disolución de glicerol; y (b) eliminar una cantidad terapéuticamente eficaz de inmunoglobulinas del fluido de diálisis o fluidos corporales. En una realización de este método, el cristal de Proteína A reticulado puede incluir además una proteína seleccionada del grupo que consiste en Proteína G, Proteína L, y sus combinaciones.
- Se describen aquí composiciones que incluyen forma cristalina reticulada de Proteína A. En algunas realizaciones, la fuente de Proteína A procede de cepas de *Staphylococcus aureus*. En todavía otras realizaciones, la Proteína A se produce por medios recombinantes, o se sintetiza químicamente. En algunas realizaciones, la Proteína A tiene una secuencia proteica nativa de longitud completa. En todavía otras realizaciones, la Proteína A contiene al menos un dominio de unión a anticuerpo. En todavía otras realizaciones, la Proteína A está modificada químicamente. En otras realizaciones, la Proteína A tiene una mutación o es un derivado funcional de una Proteína A nativa.
- Se describen aquí composiciones que incluyen forma cristalina reticulada de Proteína A. En algunas realizaciones, la composición está reticulada con glutaraldehído.
- Se describe aquí un método para purificar una inmunoglobulina, que incluye la etapa de unir dicha inmunoglobulina a una composición que incluye forma cristalina reticulada de Proteína A. En algunas realizaciones, la inmunoglobulina es un anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, un fragmento Fab, un fragmento Fc, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo completamente humano, o un anticuerpo humanizado. En otras realizaciones, la inmunoglobulina pertenece a la clase IgG. En todavía otras realizaciones de este método, la inmunoglobulina está químicamente modificada.
- Se describe aquí un método para obtener forma cristalina de Proteína A usando el método de cristalización por difusión de vapor de gota colgante o el método de cristalización por lotes, que incluye las etapas de: (a) colocar Proteína A en agua desionizada a una relación de proteína reactivo 1:1, en el que dicho reactivo se selecciona del grupo que consiste en una composición que contiene sulfato de amonio 2 M, tampón de cacodilato 0,1 M pH 6,5 y

NaCl 0,2 M; sulfato de amonio 2 M en tampón de citrato pH 5,5; citrato de sodio 1 M, tampón de Tris-HCl 0,1 M pH 7, y NaCl 0,2 M; NaH₂PO₄ 0,8 M/K₂PO₄ 1,2 M en tampón de acetato 0,1 M pH 4,5; y sulfato de amonio 2 M, tampón de Tris-HCl pH 7 y sulfato de litio 0,2 M; y (b) incubar hasta que aparezcan cristales. En algunas realizaciones de este método, la Proteína A en la etapa (a) está a una concentración de alrededor de 10 mg/ml o alrededor de 300 mg/ml de Proteína A en agua desionizada. En todavía otras realizaciones de este método, la Proteína A en la etapa (a) está a una concentración de alrededor de 50 mg/ml o alrededor de 120 mg/ml de Proteína A en agua desionizada.

Se describe aquí un método para obtener forma cristalina reticulada de Proteína A, que comprende mezclar la forma cristalina de la Proteína A con glutaraldehído. En algunas realizaciones de este método, el glutaraldehído está a una concentración final de alrededor de 0,2 a alrededor de 4%. En otras realizaciones de este método, el glutaraldehído está a una concentración final de alrededor de 1%.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos que se acompañan y la descripción a continuación.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Cristales de Proteína A en gota colgante. Se recristalizó Proteína A recombinante (120 mg/ml en H₂O DI) en gotas colgantes con un tamiz de cristalización Wizard II.

Figura 2. Cristales de proteína A por lotes. Se cristalizó Proteína A recombinante (53 mg/ml en H₂O) en lote de 1 ml con tamiz de cristalización Wizard II.

Figura 3. Cristales de Proteína A reticulados. Los cristales de Proteína A se reticularon con glutaraldehído 1% durante 20 minutos y 0,33% durante 1 hora.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden Proteína A reticulada cristalina, y a métodos para obtener y usar tales composiciones cristalinas para separar una inmunoglobulina/anticuerpos o un fragmento Fc, un fragmento Fab, anticuerpos monocatenarios y anticuerpos monoclonales de microorganismos, suero, plasma, cultivo celular de mamíferos. Las composiciones cristalinas reticuladas descritas aquí tienen la capacidad para unirse a al menos una inmunoglobulina a través de la porción Fc de esta última, de un líquido que contiene las inmunoglobulinas en una mezcla de otras sustancias.

Sin desear estar atados por ninguna teoría particular, la invención se caracteriza por que el líquido que contiene dicha inmunoglobulina/anticuerpos se pone en contacto con una fase sólida que consiste en sustancia de Proteína A reticulada cristalina que es insoluble en dicho líquido y que tiene al menos una o más inmunoglobulinas o sus regiones de unión al fragmento Fc. La parte Fc de la inmunoglobulina o el fragmento Fc es capaz de unirse al CLPC de Proteína A, de manera que dicho CLPC de Proteína A se une a la parte Fc de dicha inmunoglobulina/anticuerpo o al fragmento Fc pero no a las sustancias contaminantes en el líquido, con lo que el líquido con los contaminantes que quedan se separa de la fase sólida, y los anticuerpos unidos también se separan opcionalmente de dicha fase sólida.

El método de la presente invención se distingue de los métodos conocidos usados para el mismo fin por cuanto evita operaciones de múltiples etapas complicadas que usan, entre otros, cromatografía de intercambio iónico y también soporte sólido adicional tal como agarosa, etc. Por medio del nuevo método, la inmunoglobulina/anticuerpo/fragmentos en cuestión se obtienen en forma sorprendentemente pura de una manera muy simple en condiciones convenientes y con un rendimiento elevado. El CLPC de Proteína A en cuestión es extremadamente valioso puesto que es capaz de unirse de forma reversible y específicamente a inmunoglobulinas con una capacidad de unión muy elevada cuando se compara con Proteína A inmovilizada convencional, debido a que el enlace se efectúa en la parte Fc de la inmunoglobulina.

La inmunoglobulina en cuestión puede derivar de diferentes especies de animales, principalmente vertebrados, preferiblemente mamíferos. Como es conocido, las inmunoglobulinas pueden pertenecer a diferentes clases de inmunoglobulinas, tales como la clase A (IgA), D (IgD), E (IgE), G (IgG) y M (IgM). Un aspecto valioso de la invención es que se puede aplicar en relación con CLPC de proteína A capaz de unirse ellos mismos a inmunoglobulinas que pertenecen a la clase IgG, puesto que esta clase, entre otras, domina cuantitativamente entre las inmunoglobulinas. La parte Fc de las inmunoglobulinas se puede separar de ellas mediante métodos enzimáticos, con lo que se obtienen fragmentos de Fc libres. La parte Fc de una inmunoglobulina específica es a menudo estructuralmente similar en diferentes especies de animales. Puesto que, por ejemplo, la Proteína A de *S. aureus* reacciona con la parte Fc de IgG, el método de la presente invención permite a menudo que se sustituyan entre sí IgG de diferentes especies animales.

Según la invención, el polipéptido (CLPC de Proteína A) puede ser la denominada Proteína A de *Staphylococcus aureus*, o fragmentos de dicha proteína, teniendo dichos fragmentos naturaleza polipeptídica y teniendo la capacidad para unirse a al menos una inmunoglobulina en la parte Fc de esta última. Dichos polipéptidos (Proteína A y

fragmentos) que derivan de *S. aureus* se pueden unir a inmunoglobulinas que pertenecen a la clase IgG en sus partes Fc. Otros ejemplos son polipéptidos de *Staphylococcus epidermidis* y de otras cepas bacterianas.

5 Según la invención, se debería usar cuando se pone en práctica el método un CLPC de Proteína A (sustancia polimérica) insoluble en el líquido, con lo que la sustancia polimérica tiene al menos una inmunoglobulina o su región de unión al fragmento Fc de la misma. El CLPC de Proteína A no se puede disolver así de la fase sólida o no se puede eliminar de ella durante las operaciones de lavado. Preferiblemente, el CLPC de Proteína A se forma reticulando cristales de proteína A por medio de enlaces de naturaleza covalente.

10 El CLPC de Proteína A se puede usar en una columna que consiste en Proteína A reticulada en forma de partículas cristalinas que se preempaqueta en columnas que proporcionan una fácil purificación por afinidad de los anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos Fab de diferentes fuentes. La Proteína A reticulada cristalina se prepara usando un método de reticulación que da como resultado excelentes características de estabilidad de la proteína y unión. Las columnas están destinadas a procedimientos de flujo por gravedad tradicionales.

15 Como alternativa, el CLPC de Proteína A se puede unir al polímero (superficie sólida) o partículas magnéticas por medio de métodos usados convencionalmente cuando se unen polipéptidos, por ejemplo proteínas, a sustancias poliméricas, por ejemplo por medio de haluro de cianógeno, isocianatos, etc. Las sustancias poliméricas insolubles usadas pueden ser tales que generalmente están disponibles para fines similares, es decir, polímeros con grupos funcionales que se pueden usar cuando se unen proteínas a polímeros. Los ejemplos de tales grupos funcionales son grupos hidroxilo, grupos mercapto, grupos amino primarios y secundarios, grupos carbonilo, grupos hidrazida, grupos diazo y grupos carboxilo. Estos grupos se pueden usar cuando se forman puentes mediante métodos convencionales del polímero a una proteína, que en este caso es el CLPC de Proteína A. El polímero, que es insoluble en el líquido usado, puede, sin embargo, empaparse en dicho líquido. Por ejemplo, se puede empapar en agua cuando se usa un líquido acuoso. El polímero puede consistir en una red tridimensional obtenida, por ejemplo, reticulando un polímero tal como un polisacárido. De este modo, se pueden usar polímeros muy diferentes, por ejemplo celulosa, agarosa, poliaminoestireno, polímeros reticulados (por ejemplo, polisacáridos reticulados tales como dextrano reticulado con epíclorohidrina (Sephadex®) o con diepóxidos (por ejemplo con 1,4-butanodiol diglicidil éter)) o almidón o derivados de celulosa o polialcohol vinílico reticulado con epíclorohidrina o diepóxidos. Otros ejemplos son polímeros insolubles obtenidos haciendo reaccionar tetraetilenpentamina o hexametildiamina con epíclorohidrina o diepóxidos. Otro ejemplo es polímero de poli(acrilamida reticulado sustituido con grupos p-aminofenílicos (Enzacryl®).

20 25 30 La fase sólida puede existir en Proteína A reticulada cristalina o embebida en sustancia polimérica o membrana. En muchos casos, puede ser adecuado usar la Proteína A en forma de partículas. Otros ejemplos incluyen una pared de tubo de ensayo polimérico a la que se une un CLPC de Proteína A para purificar inmunoglobulina o su fragmento Fc, por ejemplo IgG o su fragmento Fc.

35 Las sustancias a partir de las que se separa la inmunoglobulina/anticuerpo/fragmentos relevantes mediante el método descrito aquí pueden ser de un carácter que difiere ampliamente. De este modo, tales inmunoglobulinas se pueden purificar de polipéptidos (por ejemplo, proteínas), polisacáridos, ácidos nucleicos o sustancias de bajo peso molecular de los microorganismos a partir de los cuales se produce el anticuerpo relevante.

40 El método de la presente invención se lleva a cabo en presencia de un líquido. El líquido usado es principalmente un líquido acuoso, por ejemplo una disolución acuosa de NaCl tamponada que tiene un pH adecuado, por ejemplo próximo al punto neutro.

Los anticuerpos/fragmentos relevantes de los mismos unidos al CLPC de Proteína A según la invención se pueden liberar fácilmente del CLPC en condiciones suaves, por ejemplo cambiando el pH o la fuerza iónica.

45 50 Los cristales de Proteína A (CLPC de Proteína A) como se describen aquí se pueden unir a anticuerpos o a sus fragmentos Fab, y se pueden usar en purificación o en estudios de inmunología o inmunoprecipitación de diversas fuentes sin la necesidad de ningún soporte sólido. Los cristales de Proteína A (CLPC de Proteína A) también pueden reducir los complejos inmunitarios circulantes o IgG del plasma mediante inmunoadsorción en un dispositivo extracorpóreo en un mamífero. Se describen aquí métodos para usar cristales de CLPC de Proteína A para purificar anticuerpos. Adicionalmente, se proporcionan cristales reticulados (CLPCs) de Proteína A, así como composiciones que comprenden y usan los mismos. Se describen adicionalmente métodos para producir grandes cantidades de CLPCs de proteína a partir de forma soluble de Proteína A.

Definiciones. A fin de que la presente invención se pueda entender más fácilmente, primero se definen ciertos términos. A lo largo de la descripción detallada se exponen definiciones adicionales.

55 Como se usa aquí, "anticuerpo completo o fragmento de anticuerpo" significa un anticuerpo completo o fragmento de anticuerpo, por ejemplo un fragmento Fv monocatenario o un fragmento de anticuerpo Fab, según esta invención, es un anticuerpo funcional o fragmento de anticuerpo, es decir, que es capaz de reconocer y unirse a su antígeno específico *in vitro* o *in vivo*, y puede iniciar cualesquiera acciones subsiguientes asociadas con la unión al anticuerpo, por ejemplo citotoxicidad dirigida, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término “anticuerpo” significa una glicoproteína de aproximadamente MW 150 kD, que se produce por el brazo humoral del sistema inmunitario de los vertebrados en respuesta a la presencia de moléculas extrañas en el cuerpo. Los anticuerpos son esenciales para la prevención y resolución de infección por microorganismos, por ejemplo parásitos, bacterias y virus. Los anticuerpos llevan a cabo esta función reconociendo y uniéndose a, de una manera muy específica, configuraciones de proteína (o, algunas veces, otras moléculas orgánicas que incluyen polisacáridos, glicoproteínas, lípidos, o ácidos nucleicos) denominadas antígenos (o epítomos), incluyendo aquellos que invaden microorganismos y sus productos. Los anticuerpos se unen a sus antígenos diana a través de interacciones muy específicas entre dominios hipervariables, denominados sitios de unión al antígeno, en el anticuerpo, y el propio epítomo. Al unirse al antígeno, los anticuerpos activan uno o más de los muchos sistemas efectores del sistema inmunitario que contribuyen a la neutralización, destrucción y eliminación del microorganismo infectante, u otra entidad que contiene un antígeno, por ejemplo una célula cancerosa.

Los anticuerpos también se usan para el tratamiento de cáncer, inflamación, enfermedad cardiovascular, y rechazo de transplantes, en virtud de su unión específica y neutralización subsiguiente de las dianas celulares, que están implicadas en estados mórbidos. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal Infiximab se une al factor de necrosis tumoral y neutraliza su papel en la inflamación al bloquear su interacción con el receptor de la superficie celular; mientras que Rituximab se dirige a linfocitos B malignos al unirse a su antígeno de la superficie celular CD20.

Una única molécula de anticuerpo tiene una estructura compuesta de dos cadenas pesadas idénticas (cada una de aproximadamente MW 50 kD) unidas covalentemente entre sí, y dos cadenas ligeras idénticas (cada una de aproximadamente MW 25 kD), cada una unida covalentemente a una de las cadenas pesadas. Las cuatro cadenas están dispuestas en un motivo de “Y” clásico. La “pierna” inferior de la “Y” se denomina la región Fc (“c” representa “cristalizable” o, como alternativa, “unión al complemento”), y se usa para anclar el anticuerpo en las membranas celulares, y también para unirlo a células de macrófagos y activar el complemento. Los dos “brazos” en la parte superior de la “Y” se denominan regiones Fab (el “ab” representa “unión al antígeno”). Cada región Fab contiene una región constante (en el punto de unión de las regiones Fab y Fc) y una región variable (que se extiende hasta la punta de la “Y”). Cada región variable contiene sitios de unión al antígeno idénticos (en regiones dentro de las regiones variables denominadas regiones “hipervariables”) en cada punta de la “Y”. De este modo, cada región Fab tiene un sitio de unión al antígeno, y la molécula de anticuerpo completa tiene por lo tanto dos sitios de unión al antígeno (es decir, es “bivalente”). Los dos sitios de unión al antígeno en un anticuerpo de origen natural son idénticos entre sí, y por lo tanto el anticuerpo es específico para un antígeno (es decir, es “monovalente”).

Hasta la fecha se ha aislado un número de fragmentos moleculares de moléculas de anticuerpos. Esto no ocurre de forma natural, sino que se manipulan a partir de una o más moléculas de anticuerpo completo. Estos fragmentos incluyen fragmentos Fab (un único Fab que se aísla de un anticuerpo completo mediante digestión con la enzima papaína), y fragmentos $F(ab')_2$ (dos Fabs unidos covalentemente entre sí, producidos digiriendo el anticuerpo con la enzima pepsina). Los fragmentos Fab son monoespecíficos, mientras que los fragmentos $F(ab')_2$ son biespecíficos. Recientemente, se ha introducido un número de fragmentos de anticuerpo manipulados mediante ingeniería. Éstos incluyen fragmentos Fv bicatenarios (dsFv) y fragmentos Fv monocatenarios (scFv) (la “v” representa en ambos casos “variable”). Un fragmento dsFv consiste en un fragmento Fab menos las regiones constantes, es decir, consiste solamente en las regiones variables de una cadena pesada y ligera unidas covalentemente entre sí. Un fragmento scFv es una cadena polipeptídica individual, que consiste en la región variable de una cadena pesada enlazada vía un ligador peptídico a la región variable de una cadena ligera. Clásicamente, ambos fragmentos dsFv y scFv son monovalentes (y de este modo monoespecíficos). Sin embargo, dos fragmentos dsFv o dos fragmentos scFv se pueden enlazar ellos mismos para formar un fragmento biespecífico (que sería análogo a un fragmento $F(ab')_2$ sin las regiones constantes). Además, es posible enlazar dos fragmentos dsFv o fragmentos scFv con sitios de unión al antígeno diferentes (es decir, diferentes especificidades), para formar un fragmento biespecífico. Tales fragmentos se pueden usar como herramientas de investigación o como reactivos terapéuticos o de diagnóstico.

Hay cinco clases de anticuerpos (también denominados inmunoglobulinas) en seres humanos: IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, cada uno con sus propias características únicas y función. IgG, IgD, e IgE están todos formados por una molécula de anticuerpo, mientras que IgA puede estar formado de una, dos o tres de tales moléculas, e IgM consta de cinco. Además, en seres humanos, hay cuatro subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4), y dos subclases de cada uno de IgM e IgA (1 y 2, respectivamente). Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal Rituximab (Rituxan™) es un anticuerpo IgG1.

Aunque los anticuerpos de origen natural derivan de especies individuales, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos manipulados mediante ingeniería pueden derivar de más de una especie de animal, es decir, pueden ser quiméricos. Hasta la fecha, se han generado anticuerpos quiméricos de ratón (murino)/humano, aunque son posibles otras combinaciones de especies. Los anticuerpos quiméricos se han roto además en dos subtipos: quiméricos y humanizados. Los anticuerpos quiméricos murino/humano contienen aproximadamente 75% de secuencias de aminoácidos humanas y 25% de secuencias de aminoácidos de ratón, respectivamente. Las secuencias humanas representan las regiones constantes del anticuerpo, mientras que las secuencias de ratón representan las regiones variables (y de este modo contienen los sitios de unión al antígeno) del anticuerpo. La razón para usar tales quimeras es para retener la especificidad por el antígeno del anticuerpo de ratón, pero reducir la inmunogenicidad del anticuerpo de ratón (un anticuerpo murino podría provocar una respuesta inmunitaria contra él en especies distintas del ratón), y de este modo ser capaces de emplear la quimera en terapias humanas. Los

anticuerpos quiméricos también incluyen aquellos que comprenden regiones CDR procedentes de anticuerpos humanos diferentes. Las regiones CDR, también denominadas regiones hipervariables, son secuencias dentro de las regiones variables de moléculas de anticuerpos que generan los sitios de unión al antígeno. Las regiones CDR se denominan así debido a que el sitio de unión es complementario en forma y distribución de carga al epítipo reconocido en el antígeno.

Como alternativa, los anticuerpos quiméricos comprenden regiones del marco de un anticuerpo y regiones CDR de otro anticuerpo. Los anticuerpos quiméricos también incluyen aquellos que comprenden regiones CDR de al menos dos anticuerpos humanos diferentes. Los anticuerpos humanizados contienen aproximadamente 90% (o más) de secuencias de aminoácidos humanas. Las únicas secuencias murinas presentes son aquellas para la región hipervariable (que son los sitios de unión al antígeno reales contenidos en la región variable). Los anticuerpos humanizados tienen inmunogenicidad mínima de ratón en comparación con anticuerpos quiméricos.

Generalmente hay dos tipos de anticuerpos que se pueden distinguir por sus especificidades: anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos policlonales son aquellos que se encuentran como la fracción inmunoglobulínica de la sangre, y son esencialmente una mezcla policlonal de muchos tipos diferentes de anticuerpos específicos para los diferentes antígenos a los que se ha expuesto el individuo (es decir, se originan a partir de muchos clones diferentes de linfocitos B (o células B), la célula que produce anticuerpos).

Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos de una especificidad única, es decir, que derivan de un único clon de linfocitos B (células B). Estos anticuerpos tienen especificidad exquisita por sus antígenos diana, y también se pueden producir en cantidades elevadas (es decir, títulos elevados). Son útiles como marcadores para antígenos específicos (por ejemplo, antígenos del cáncer), como agentes de diagnóstico (por ejemplo, en ensayos para detectar virus como HIV-1), y como agentes terapéuticos. Los anticuerpos monoclonales completos son aquellos que tienen una estructura molecular clásica que incluye dos cadenas pesadas completas y dos cadenas ligeras completas. Esto se distingue de fragmentos de anticuerpos, tales como Fab, F(ab')₂, fragmentos Fc, fragmentos dsFv, y fragmentos scFv.

Tradicionalmente, los anticuerpos monoclonales se han producido fusionando la célula B productora de anticuerpos con una célula de hibridoma inmortal para generar hibridomas de células B, que producen continuamente anticuerpos monoclonales en cultivo celular. Otro método que se usa tradicionalmente para generar anticuerpos monoclonales implica la expresión de los anticuerpos monoclonales en cultivo de células bacterianas usando tecnología de presentación de fagos. Actualmente, sin embargo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir *in vivo* en grandes cantidades en animales modificados genéticamente, tales como vacas y cabras (Genzyme Transgenics), cerdos y conejos (Medarex, PPL Therapeutics), y pollos (Tranxenogen), y en plantas, tales como tabaco y maíz (Epicyte, Integrated Protein Technologies, Meristem CropTech, y otras). Por ejemplo, se pueden encontrar grandes cantidades de anticuerpos monoclonales en la leche de cabras genéticamente modificadas (Genzyme Transgenics). CLPC de Proteína A se puede usar para purificar anticuerpos de todas las citadas fuentes según esta invención. Además, como resultado de la transgénica, se han modificado ratones para que contengan y expresen todo el genoma de la célula B humana (que codifica anticuerpos humanos). Por lo tanto, tales ratones transgénicos (Abgenix) son una fuente de anticuerpos humanos que se pueden purificar usando CLPC de Proteína A según esta invención. Se debería señalar que la glicosilación es específica para el animal que está produciendo los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos humanos procedentes de fuentes distintas de los seres humanos tendrán perfiles de glicosilación sutilmente diferentes. Por lo tanto, los anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpos Fv monocatenarios o fragmentos de anticuerpos Fab de esta invención pueden presentar glicosilación modificada, o pueden estar desglucosilados. Los anticuerpos que se pueden purificar usando CLPC de Proteína A según esta invención incluyen también anticuerpos derivatizados. Tales anticuerpos incluyen aquellos derivatizados con polietilenglicol o al menos un resto de hidrato de carbono o al menos un grupo metilo o etilo.

Los anticuerpos clínicamente relevantes también se pueden clasificar según el área terapéutica en la que se van a emplear. Tales anticuerpos incluyen, por ejemplo, aquellos para tratar cánceres (por ejemplo, cáncer pancreático), enfermedades inflamatorias (por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, artritis), enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, apoplejías), enfermedad infecciosa (por ejemplo, HIV-SIDA), enfermedades respiratorias (por ejemplo, asma), rechazo de trasplante tisular y rechazo de trasplante de órganos. Tales anticuerpos también incluyen anticuerpos para radioinmunoterapia. Los anticuerpos que se pueden purificar según la presente invención incluyen, por ejemplo, Abciximab, Palivizumab, Murumonab-CD3, Gemtuzumab, Trastuzumab, Basiliximab, Daclizumab, Etanercept e Ibritumomab tiuxetan.

Como se usa aquí, "mezcla de disolventes acuosos-orgánicos" significa una mezcla que comprende n% de disolvente orgánico, en la que n está entre 1 y 99, y m% acuoso, en la que m es 100-n.

Como se usa aquí, "polímeros biocompatibles" significan polímeros que son no antigénicos (cuando no se usan como un adyuvante), no carcinógenos, no tóxicos, y que no son de otro modo inherentemente incompatibles con organismos vivos. Los ejemplos incluyen: poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptidos), poli(ésteres) tales como poli(ácido láctico) o PLA, poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(β-hidroxibutirato), poli(caprolactona) y poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil)-metacrilamida), poli[(organo)fosfaceno], poli(ortoésteres), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido

maleico - alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, sus mezclas y copolímeros.

5 Como se usa aquí, “polímeros biodegradables” significa polímeros que se degradan mediante hidrólisis o solubilización. La degradación puede ser heterogénea – que ocurre principalmente en la superficie de las partículas, u homogénea – que se degrada uniformemente a lo largo de la matriz polimérica.

10 Como se usa aquí, una “muestra biológica” es material biológico recogido de células, tejidos, órganos u organismos, por ejemplo, para detectar un analito. Ejemplos de muestras biológicas incluyen una muestra de fluido, células o tejidos. Los fluidos biológicos incluyen, por ejemplo, suero, sangre, plasma, saliva, orina o sudor. Las muestras de células o tejidos incluyen biopsias, tejidos, suspensiones celulares u otros especímenes y muestras, por ejemplo muestras clínicas.

Como se usa aquí, un copolímero significa un polímero formado por más de una especie monomérica.

Como se usa aquí, un emulsionante es un agente tensioactivo que reduce la tensión interfacial entre cristales revestidos de polímero y una disolución.

15 Un “cristal” es una forma del estado sólido de la materia, que comprende átomos dispuestos en un patrón que se repite periódicamente en las tres dimensiones (véase, *por ejemplo*, Barret, Structure of Metals, 2ª edición, McGraw-Hill, Nueva York (1952)). Una forma cristalina de un polipéptido, por ejemplo, es diferente de una segunda forma - el estado sólido amorfo. Los cristales muestran propiedades características, incluyendo forma, estructura reticular, porcentaje de disolvente, y propiedades ópticas, tales como, *por ejemplo*, índice de refracción.

20 Como se usa aquí, una “forma de cristal reticulada de proteína” tiene la propiedad de que los cristales de proteína reticulados permanecen insolubles y en el estado sólido cuando se añaden a disolución.

25 Un “dispositivo extracorpóreo” es una estructura que no está dentro del cuerpo para poner un fluido corporal en contacto con cristales de Proteína A en el tratamiento de un individuo. Preferiblemente, un dispositivo extracorpóreo es un dispositivo usado para diálisis, incluyendo diálisis renal, un dispositivo para hemofiltración arterio-venosa continua, un oxigenador de membrana extracorpóreo, u otro dispositivo usado para filtrar productos de desecho de la corriente sanguínea. Del mismo modo, los componentes de dispositivos para filtrar productos de desecho están abarcados por la expresión, incluyendo un tubo, un material poroso, o una membrana, por ejemplo. En particular, un dispositivo extracorpóreo puede ser un dispositivo de diálisis. También puede ser una membrana de un dispositivo de diálisis.

30 Un “fragmento funcional” de Proteína A es una porción de un polipéptido de Proteína A que retiene una o más actividades de unión frente a anticuerpos o sus fragmentos Fab de la Proteína A, tal como la capacidad para ser usado en la purificación de anticuerpos. Como se usa aquí, un fragmento funcional puede comprender truncamientos terminales en uno o en ambos extremos, a no ser que se especifique de forma diferente. Por ejemplo, un fragmento funcional puede tener 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15 ó 20 o más restos omitidos del término amino y/o carboxilo de un polipéptido de Proteína A. Preferiblemente, los truncamientos no son superiores a 20 aminoácidos en uno o en ambos extremos. Un fragmento funcional puede estar enlazado opcionalmente a una o más secuencias heterólogas o mutaciones de cualquier aminoácido en la secuencia nativa original de Proteína A.

35 El término “individuo” o “sujeto” se refiere a cualquier mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, cualquier animal clasificado como tal, incluyendo seres humanos, primates no humanos, primates, babuinos, chimpancés, monos, roedores (*por ejemplo*, ratones, ratas), conejos, gatos, perros, caballos, vacas, ovejas, cabras, cerdos, etc.

40 Forma insoluble y estable de una proteína. Una forma de una proteína que es insoluble en disolventes acuosos, disolventes orgánicos o en mezclas de disolventes acuosos-orgánicos, y que presenta mayor estabilidad que la forma soluble de la proteína. Según una realización alternativa de esta invención, la frase “forma insoluble y estable de una proteína” puede ser una proteína que es insoluble en formulaciones secas y húmedas. En cualquier realización, los cristales de proteína reticulados pueden ser activos en forma insoluble.

45 El término “aislado” se refiere a una molécula que está esencialmente libre de su entorno natural. Por ejemplo, una proteína aislada está esencialmente libre de material celular u otras proteínas de la fuente celular o tisular de la que se deriva. El término se refiere a preparaciones en las que la proteína aislada es suficientemente pura para ser administrada como una composición terapéutica, o presenta una pureza de al menos 70% a 80% (p/p), más preferiblemente una pureza de al menos 80%, 90% (p/p), incluso más preferiblemente, una pureza de 90 a 95%, y
50 muy preferiblemente una pureza de al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% o 100% (p/p).

Como se usa aquí, la expresión “alrededor de” se refiere hasta $\pm 10\%$ del valor calificado por dicho término. Por ejemplo, alrededor de 50 mM se refiere a $50 \text{ mM} \pm 5 \text{ mM}$; alrededor de 4% se refiere a $4\% \pm 0,4\%$.

55 Como se usa aquí, “sustrato macromolecular” significa una gran biomolécula, tal como una proteína o un hidrato de carbono que tiene un peso molecular de al menos 600-700 Daltons, que es también un sustrato para una reacción catalizada por el constituyente proteico de un cristal de proteína reticulado.

La expresión “disolventes orgánicos” significa cualquier disolvente de origen no acuoso.

Los constituyentes proteicos de las formulaciones de cristal de proteína reticulado de esta invención pueden estar modificados natural o sintéticamente. Pueden ser glicoproteínas, proteínas sin modificar, o pueden contener otras modificaciones.

- 5 Como se usa aquí, “actividad de proteína” significa una actividad seleccionada del grupo que consiste en unión, catálisis, o actividades que generan una respuesta funcional en el entorno en el que se usa la proteína, tal como la unión de inmunoglobulinas, inmunoprecipitación, o sus combinaciones.

La expresión “forma soluble de proteína” significa moléculas de proteína individuales en disolución y disociadas de una red cristalina.

- 10 Las expresiones “dosis terapéuticamente eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” se refieren a aquella cantidad de un compuesto que da como resultado la prevención, el retraso de la aparición de los síntomas, o la mejoría de los síntomas de una afección relacionada con el sistema inmune, tal como púrpura trombocitopénica. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz será suficiente para tratar, prevenir, reducir la gravedad, retrasar la aparición, y/o reducir el riesgo de aparición de uno o más síntomas de un trastorno asociado a concentraciones elevadas de inmunoglobulinas/IgGs o sus subclases. La cantidad eficaz se puede determinar mediante métodos bien conocidos en la técnica.

- 15 Los términos “tratamiento”, “terapia” y sus afines, se refieren al tratamiento de un trastorno existente y/o a medidas profilácticas/preventivas. Los sujetos que requieren tratamiento pueden incluir individuos que ya padecen un trastorno médico particular, y también aquellos que tienen riesgo de padecer o que en última instancia pueden llegar a padecer el trastorno. La necesidad de tratamiento se evalúa, por ejemplo, por la presencia de uno o más factores de riesgo asociados con el desarrollo de un trastorno, la presencia o progresión de un trastorno, o la receptividad probable al tratamiento de un sujeto que padece el trastorno. El tratamiento puede incluir ralentizar o invertir la progresión de un trastorno.

- 20 El término “polímero” significa una molécula grande formada por la repetición de unidades químicas simples, pequeñas. Las unidades que se repiten pueden ser lineales o ramificadas, para formar redes interconectadas. La unidad repetida es habitualmente equivalente o casi equivalente al monómero.

- 25 Vehículos poliméricos, como se usa aquí, significa polímeros usados para el encapsulamiento de CLPC de Proteína A para la purificación o para el suministro de tal CLPC de Proteína A, incluyendo el suministro biológico. Tales polímeros incluyen polímeros biocompatibles y biodegradables. El vehículo polimérico puede ser un único tipo de polímero, o puede estar compuesto de una mezcla de tipos de polímeros. Polímeros útiles como el vehículo polimérico incluyen, por ejemplo, poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptidos), poli(ésteres) tales como poli(ácido láctico) o PLA, poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(β -hidroxibutirato), poli(caprolactona) y poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil)-metacrilamida), poli[(organo)fosfaceno], poli(ortoésteres), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico - alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, polipéptidos naturales o sintéticos, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, almidones modificados tales como almidón de amilosa, almidón de amilopectina, hidroxietil almidón, metacrilato de almidón, y otros almidones, y cualquier material convencional que encapsulará cristales de proteína.

- 30 Como se usa aquí, Proteína A se refiere a un polipéptido de cepas de *Staphylococcus aureus*. La Proteína A es un grupo de polipéptidos conocido en la técnica capaz de unirse a inmunoglobulina o sus fragmentos Fc. La Proteína A es un componente de la pared celular producido por varias cepas de *Staphylococcus aureus*, que consiste en una única cadena polipeptídica de peso molecular 42.000 que contiene poco o ningún hidrato de carbono. Consta de seis regiones, cinco de las cuales se unen a IgG. La Proteína A se une específicamente a la región Fc de moléculas inmunoglobulínicas, especialmente IgG. La molécula de Proteína A contiene cuatro sitios de unión de alta afinidad ($K_A = 10^8/M$) capaces de interactuar con la región Fc de varias especies. La molécula es termoestable y retiene su conformación nativa cuando se expone a reactivos desnaturalizantes tales como urea 4 M, tiocianato 4 M e hidrocloreuro de guanidina 6 M.

- 35 La Proteína A inmovilizada se ha usado ampliamente para el aislamiento de IgG de varias especies de mamíferos. Sin embargo, la interacción entre Proteína A e IgG no es equivalente para todas las especies. Incluso dentro de una especie, la Proteína A interactúa con algunos subgrupos de IgG y no con otros. Por ejemplo, IgG₁, IgG₂ e IgG₄ humanas se unen fuertemente, mientras que IgG₃ no se une, e IgG₁ de ratón se une pobremente a Proteína A. También hay muchos casos en los que anticuerpos monoclonales no se unen a Proteína A, tales como la mayoría de inmunoglobulinas de rata. A pesar de sus características de unión variables, la Proteína A posee propiedades de unión a IgG que la hacen ideal para la purificación de IgG por afinidad. Una molécula de Proteína A inmovilizada se puede unir a al menos dos moléculas de IgG.

Otra proteína, Proteína G, una proteína de la superficie celular de *Streptococci* Grupo G, es un receptor de Fc tipo III, y se une a IgG con un mecanismo no inmunitario similar al de la Proteína A. También se puede usar para purificación de IgGs una forma recombinante de la proteína producida en *E. coli*, de la que se ha suprimido

genéticamente la región de la proteína nativa que se une a albúmina. La proteína G recombinante contiene dos regiones de unión a Fc.

Otra proteína de unión a anticuerpos, Proteína L, es una proteína de la superficie celular de la especie bacteriana *Peptostreptococcus magnus*, y se encuentra que se une a Ig a través de la interacción de la cadena L. Consta de 719 restos de aminoácidos. El peso molecular de Proteína L purificada a partir de las paredes celulares de *Peptostreptococcus magnus* se estimó primeramente como 95 kD mediante SDS-PAGE en presencia de agente reductor 2-mercaptoetanol, mientras que se determinó que el peso molecular es 76 kD mediante cromatografía en gel en presencia de guanidina HCl 6 M. A diferencia de la Proteína A y Proteína G, que se unen a la región Fc de inmunoglobulinas (anticuerpos), la Proteína L se une a anticuerpos a través de interacciones de la cadena ligera. Puesto que en la interacción de unión no está implicada ninguna parte de la cadena pesada, la Proteína L se une a un intervalo más amplio de clases de anticuerpos que la Proteína A o G. La Proteína L se une a representantes de todas las clases de anticuerpos, incluyendo IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. Los fragmentos variables monocatenarias (scFv) y los fragmentos Fab también se unen a Proteína L. La unión a Proteína L está restringida a aquellos anticuerpos que contienen cadenas ligeras kappa. Dados los requisitos específicos para la unión eficaz, la aplicación principal para Proteína L inmovilizada es la purificación de anticuerpos monoclonales de ascitis o sobrenadante de cultivo celular que se sabe que tienen la cadena ligera kappa.

La presente invención tiene aplicabilidad a isoformas de Proteína A, y glicofomas de esas isoformas.

La Proteína A se usa para preparar los cristales que se usan en los métodos descritos aquí. La Proteína A se puede aislar, por ejemplo, a partir de una fuente natural, o se puede derivar de una fuente natural. Como se usa aquí, la expresión "derivado de" significa que tiene una secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos naturalmente existente en la fuente. Por ejemplo, la Proteína A derivada de *Staphylococcus aureus* comprenderá una secuencia primaria de un polipéptido de Proteína A de *Staphylococcus aureus*, o será codificada por un ácido nucleico que comprende una secuencia encontrada presente en *Staphylococcus aureus* que codifica una Proteína A o una degenerada de ésta. Una proteína o ácido nucleico derivado de una fuente engloba moléculas que se aíslan de la fuente, se producen por recombinación, y/o se sintetizan o modifican químicamente. Los cristales proporcionados aquí se pueden formar a partir de polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos de Proteína A, o de un fragmento funcional de Proteína A que retiene la región o regiones de unión a anticuerpos. Preferiblemente, la Proteína A retiene al menos una característica de unión funcional de una Proteína A de origen natural, por ejemplo retiene una o más de la capacidad para unirse a al menos un anticuerpo.

La Proteína A se ha aislado previamente, y de este modo está disponible de muchas cepas de *Staphylococcus aureus*, incluyendo Newman, Cowan etc. La Proteína A también se puede adquirir de proveedores comerciales, tales como, por ejemplo, Sigma, Repligen y GE. Los métodos para aislar proteína A a partir de una fuente natural se han descrito, por ejemplo, en las siguientes referencias: "Nucleotide sequence analysis of the gene for Protein A from *Staphylococcus aureus* Cowan 1 (NCTC8530) and its enhanced expression in *Escherichia coli*". Shuttleworth H.L., Duggleby C.J., Jones S.A., Atkinson T., Minton N.P. Gene 58:283-295(1987); "Structural studies on the four repetitive Fc-binding regions in Protein A from *Staphylococcus aureus*". Sjoedahl J. Eur. J. Biochem. 78:471-490(1977); estas Proteínas A aisladas se pueden usar para formar los cristales y métodos descritos aquí.

Alternativamente, se puede usar Proteína A recombinante para formar los cristales y para los métodos proporcionados aquí. En algunos casos, la Proteína A recombinante engloba o es codificada por secuencias de una secuencia de Proteína A de origen natural. Además, se describe aquí Proteína A que comprenden una secuencia de aminoácidos que es homóloga o sustancialmente idéntica a una secuencia de origen natural. También, se proporciona Proteína A codificada por un ácido nucleico que es homólogo o sustancialmente idéntico a un ácido nucleico que codifica Proteína A de origen natural, y ésta se puede cristalizar y/o administrar como se describe aquí.

Los polipéptidos calificados aquí como "recombinantes" son polipéptidos que se han producido por metodología de ADN recombinante, incluyendo aquellos generados mediante procedimientos basados en un método de recombinación artificial, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o la clonación en un vector usando enzimas de restricción. Los polipéptidos "recombinantes" son también polipéptidos que tienen una expresión alterada, tal como un polipéptido de origen natural con expresión modificada por recombinación en una célula, tal como una célula huésped.

En una realización, la Proteína A se produce por recombinación a partir de un ácido nucleico que es homólogo a una secuencia de ácido nucleico de Proteína A de *Staphylococcus aureus*, y en algunos casos se modifica, *por ejemplo*, para aumentar u optimizar la producción recombinante en un hospedante heterólogo.

Los polipéptidos de Proteína A útiles para formar cristales de Proteína A pueden expresarse en una célula hospedante, tal como una célula hospedante que comprende un constructo de ácido nucleico que incluye una secuencia codificante para un polipéptido de Proteína A o un fragmento funcional del mismo. Una célula hospedante adecuada para la expresión de Proteína A puede ser una célula de levadura, bacteria, hongo, insecto, planta o mamífero, por ejemplo, o de plantas transgénicas, animales transgénicos, o un sistema libre de células. Preferiblemente, una célula hospedante es capaz de glicosilar el polipéptido de Proteína A en caso necesario, de establecer enlaces de disulfuro, de segregar la Proteína A, y/o de soportar la multimerización de polipéptidos de

Proteína A. Las células hospedantes preferidas incluyen, pero sin limitarse a, células de *E. coli* (incluyendo *E. coli* Origami B y *E. coli* BL21), *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus*, células Sf9, células de ovario de hámster chino (CHO) y células 293 (riñón embrionario humano), y otras células humanas. También son hospedantes adecuados para la producción de Proteína A las plantas transgénicas, animales transgénicos, incluyendo cerdo, vaca, cabra, caballo, pollo y conejo.

Para la producción recombinante de Proteína A, un hospedante o una célula hospedante debería comprender un constructo en forma de un plásmido, vector, fagómido o casete de transcripción o expresión que comprenda al menos un ácido nucleico que codifica una Proteína A o un fragmento funcional de la misma. Existen diversos constructos disponibles, incluyendo aquellos que se mantienen en copia individual o copia múltiple, o que se integran en el cromosoma de la célula hospedante. Hay disponibles comercialmente muchos sistemas, componentes y reactivos para la expresión recombinante, por ejemplo de Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA); U.S. Biological (Swampscott, MA); BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA); Novagen (Madison, WI); Stratagene (La Jolla, CA); y Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), (Braunschweig, Alemania).

La expresión recombinante de Proteína A se controla opcionalmente mediante un promotor heterólogo, incluyendo un promotor constitutivo y/o inducible. También son apropiados promotores tales como, por ejemplo, T7, el promotor de alcohol-oxidasa (AOX), promotores de dihidroxi-acetona-sintasa (DAS), el promotor Gal 1,10, el promotor de fosfoglicerato cinasa, el promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, el promotor de alcohol deshidrogenasa, el promotor de metalotioneína de cobre (CUP1), el promotor de fosfatasa ácida, CMV y promotores polihedrina. El promotor particular se selecciona en base al hospedante o a la célula hospedante. Además, también se pueden usar, por ejemplo, promotores que son inducibles por metanol, sulfato de cobre, galactosa, mediante poco fosfato, por alcohol, por ejemplo etanol, y son bien conocidos en la técnica.

Un ácido nucleico que codifica la Proteína A puede comprender opcionalmente secuencias heterólogas. Por ejemplo, en algunas realizaciones se incluye una secuencia de secreción en el término N de un polipéptido de Proteína A. Pueden ser útiles secuencias señal tales como las de factor de emparejamiento α , BGL2, fosfatasa ácida de levadura (PHO), xilanasa, alfa-amilasa, de otras proteínas segregadas por levadura, y péptidos señal de secreción derivados de otras especies que son capaces de dirigir la secreción desde la célula hospedante. De forma similar, otras secuencias heterólogas, tales como ligadores (*por ejemplo*, que comprenden un sitio de escisión o de endonucleasas de restricción) y uno o más elementos de control de la expresión, un potenciador, un terminador, una secuencia líder, y una o más señales de traducción, entran dentro del alcance de esta descripción. Estas secuencias se pueden incluir opcionalmente en un constructo y/o se pueden enlazar al ácido nucleico que codifica Proteína A. A no ser que se especifique otra cosa, las secuencias “enlazadas” pueden estar asociadas entre sí directa o indirectamente.

De forma similar, un epitopo o etiqueta de afinidad, tal como histidina, HA (péptido de hemaglutinina), proteína de unión de maltosa, AviTag®, FLAG, o glutatona-S-transferasa, también puede estar opcionalmente enlazado al polipéptido de Proteína A. Una etiqueta se puede escindir opcionalmente de la Proteína A después de producir o purificar ésta. El experto puede seleccionar fácilmente secuencias heterólogas apropiadas, por ejemplo, emparejar la célula hospedante, el constructo, el promotor y/o la secuencia señal de secreción.

Los homólogos o variantes de Proteína A difieren de una secuencia de Proteína A de referencia en uno o más restos. Por ejemplo, los aminoácidos estructuralmente similares se pueden sustituir por algunos de los aminoácidos especificados. Los aminoácidos estructuralmente similares incluyen: (I, L y V); (F e Y); (K y R), (Q y N); (D y E); y (G y A). Los homólogos de Proteína A aquí descritos también engloban la supresión, adición o sustitución de aminoácidos. Tales homólogos y variantes incluyen (i) variantes polimórficas y mutantes naturales o artificiales, (ii) polipéptidos modificados en los que uno o más restos están modificados, y (iii) mutantes que comprenden uno o más restos modificados.

Un polipéptido o ácido nucleico de Proteína A es “homólogo” (o es un “homólogo”) si es al menos 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntico a una secuencia de referencia. Si el homólogo no es idéntico a la secuencia de referencia, es una “variante”. Un homólogo es “sustancialmente idéntico” a una secuencia de Proteína A de referencia si la secuencia nucleotídica o de aminoácidos del homólogo difiere de la secuencia de referencia (*por ejemplo*, por truncamiento, supresión, sustitución o adición) en no más de 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 20 ó 50 restos, y retiene (o codifica un polipéptido que retiene) la capacidad de unirse a inmunoglobulinas/anticuerpos o sus fragmentos Fab. Los fragmentos de una Proteína A pueden ser homólogos, incluyendo variantes y/o secuencias sustancialmente idénticas. A título de ejemplo, los homólogos pueden derivar de diversas fuentes de Proteína A, o pueden derivar de o están relacionados con una secuencia de referencia mediante mutación por truncamiento, supresión, sustitución o adición. El porcentaje de identidad entre dos secuencias nucleotídicas o de aminoácidos se puede determinar mediante algoritmos de alineación estándar tales como, por ejemplo, Basic Local Alignment Tool (BLAST) descrito por Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403 410 (1990), el algoritmo de Needleman et al., *J. Mol. Biol.*, 48:444 453 (1970), o el algoritmo de Meyers et al., *Comput. Appl. Biosci.* 4:11 17 (1988). Tales algoritmos están incorporados en los programas BLASTN, BLASTP, y “BLAST 2 Sequences” (examinados en McGinnis y Madden, *Nucleic Acids Res.* 32:W20-W25, 2004). Cuando se utilizan estos programas, se pueden usar los parámetros por defecto. Por ejemplo, para secuencias nucleotídicas se pueden usar los siguientes ajustes para “BLAST 2 Sequences”: programa BLASTN, premio por apareamiento 2, penalización por

desapareamiento 2, penalizaciones por salto abierto y salto de extensión 5 y 2, respectivamente, salto $x_{dropoff}$ 50, previsto 10, tamaño de palabra 11, filtro ON. Para las secuencias de aminoácidos se pueden usar los siguientes ajustes para "BLAST 2 Sequences"; programa BLASTP, matriz BLOSUM62, penalizaciones por salto abierto y salto de extensión 11 y 1, respectivamente, salto $x_{dropoff}$ 50, previsto 10, tamaño de palabra 3, filtro ON. Las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos para Proteína A que son apropiadas para formar los cristales descritos aquí pueden incluir secuencias homólogas, variantes o sustancialmente idénticas.

Preparación de cristales de proteína reticulados – cristalización de proteína

Los cristales de proteínas se hacen crecer mediante cristalización controlada de proteína fuera de disolución acuosa o disolventes orgánicos que contienen disolución acuosa. Las condiciones a controlar incluyen, por ejemplo, la velocidad de evaporación del disolvente, la presencia de cosolutos y tampones apropiados, pH y temperatura. Un repaso completo de los diversos factores que afectan a la cristalización de proteínas se ha publicado por McPherson, *Methods Enzymol.*, 114, p. 112-20 (1985). McPherson y Gilliland, *J. Crystal Growth*, 90, p. 51-59 (1988) han compilado listas completas de proteínas y ácidos nucleicos que se han cristalizado, así como las condiciones en las que se cristalizaron. En el Protein Data Bank en la Brookhaven National Laboratory [<http://www.pdb.bnl.gov>; Bernstein et al., *J. Mol. Biol.*, 112, p. 535-42 (1977)] se mantiene un compendio de cristales y recetas de cristalización, así como un depósito de coordenadas de estructuras resueltas de proteínas y ácidos nucleicos. Estas referencias se pueden usar para determinar las condiciones necesarias para la cristalización de una proteína, como un preludeo para la formación de un cristal de proteína reticulado apropiado, y pueden guiar la estrategia de cristalización para otras proteínas. Como alternativa, en la mayoría de los casos, una estrategia de investigación inteligente de ensayo y error puede producir condiciones de cristalización adecuadas para muchas proteínas, con la condición de que se logre un nivel aceptado de pureza para ellas (véase, por ejemplo, C.W. Carter, Jr. y C.W. Carter, *J. Biol. Chem.*, 254, p. 12219-23 (1979)).

Los cristales individuales grandes que son necesarios para los análisis de difracción mediante rayos X no son necesarios para uso en los métodos descritos aquí. Son adecuadas duchas microcristalinas.

Por ejemplo, los cristales de proteína reticulados pueden tener una longitud máxima entre alrededor de 0,01 μm y alrededor de 500 μm , alternativamente entre 0,1 μm y alrededor de 50 μm . También pueden tener una forma seleccionada del grupo que consiste en: esferas, agujas, barras, placas, tales como hexágonos y cuadrados, romboides, cubos, bipirámides y prismas.

En general, los cristales se producen combinando la proteína a cristalizar con un disolvente acuoso apropiado o con un disolvente acuoso que contiene agentes de cristalización apropiados, tales como sales o disolventes orgánicos. El disolvente se combina con la proteína y se puede someter a agitación a una temperatura determinada experimentalmente para que sea apropiada para inducir la cristalización y aceptable para mantener la actividad y estabilidad de la proteína. El disolvente puede incluir opcionalmente co-solutos, tales como cationes divalentes, cofactores o agentes caotrópicos, así como especies tampón para controlar el pH. Para facilitar la cristalización, la necesidad de co-solutos y sus concentraciones se determinan experimentalmente.

En un procedimiento a escala industrial, la precipitación controlada que conduce a la cristalización puede llevarse a cabo mejor mediante la combinación simple de la proteína, el precipitante, co-solutos y, opcionalmente, tampones en un procedimiento por lotes. Como otra opción, las proteínas se pueden cristalizar usando precipitados de proteína como material de partida. En este caso, los precipitados de proteína se añaden a una disolución de cristalización y se incuban hasta que se forman cristales. También se pueden adoptar métodos de cristalización en laboratorio alternativos, tales como diálisis o difusión de vapor. McPherson, más arriba, y Gilliland, más arriba, incluyen una lista completa de condiciones adecuadas en sus repastos de la bibliografía de cristalización.

Ocasionalmente, la incompatibilidad entre el agente de reticulación y el medio de cristalización puede requerir intercambiar los cristales en un sistema de disolvente más adecuado.

Muchas de las proteínas para las que ya se han descrito condiciones de cristalización se pueden usar para preparar cristales de proteínas reticulados según esta invención. Sin embargo, se debería observar que las condiciones dadas a conocer en la mayoría de las referencias citadas anteriormente se han optimizado para producir, en la mayoría de los casos, unos pocos cristales grandes, de calidad de difracción. En consecuencia, los expertos en la técnica apreciarán que puede ser necesario cierto grado de ajuste de estas condiciones para proporcionar un procedimiento de rendimiento elevado para la producción a gran escala de los cristales más pequeños usados en la obtención de cristales de proteína reticulados.

Preparación de cristales de proteína reticulados – reticulación de cristales de proteína

Cristales estabilizados. Una vez que se han hecho crecer los cristales de Proteína A en un medio adecuado, se estabilizan mediante reticulación. La reticulación da como resultado una estabilización de la red cristalina mediante la introducción de enlaces covalentes entre las moléculas proteicas que constituyen el cristal. Esto posibilita la transferencia de la proteína a un entorno alternativo que de otro modo podría ser incompatible con la presencia de la red cristalina o incluso con la existencia de proteína intacta. Los cristales de Proteína A se pueden reticular, *por*

ejemplo, a través de grupos amina de lisina, grupos tiol (sulfhidrido), y restos de carbohidratos. Los cristales reticulados también se denominan aquí "CLPC de Proteína A", "Proteína A de CLPC" o "CLPC".

5 Un cristal reticulado puede alterar la estabilidad enzimática (*por ejemplo*, pH, temperatura, estabilidad mecánica y/o química), el perfil de pH de la unión a anticuerpos, la solubilidad, la uniformidad del tamaño o volumen de los cristales, la velocidad de liberación de anticuerpo unido a partir del cristal, y/o el tamaño de poros y la forma entre moléculas individuales en la red cristalina subyacente.

10 Ventajosamente, la reticulación o estabilización de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo de tal manera que los cristales comprenden una Proteína A que muestra una actividad de alrededor de 60%, 80%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300% o más de la capacidad de unión/por ml de cristales (unión de anticuerpos) en comparación con una Proteína A inmovilizada por ml del gel. La estabilidad se puede incrementar en al menos alrededor de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300% o más en comparación con Proteína A soluble o inmovilizada. La estabilidad se puede medir en condiciones de almacenamiento, tales como estabilidad de pH, estabilidad de temperatura, estabilidad frente a proteasas, estabilidad de disolución y como estabilidad de columna *in vitro*, por ejemplo.

15 En algunas realizaciones, la reticulación ralentiza la disolución de los polipéptidos de Proteína A en el cristal en disolución, inmovilizando efectivamente las moléculas de proteína en las partículas microcristalinas. Al exponerse a un activador en el entorno que rodea a los cristales de proteína reticulados, tal como en condiciones de uso en lugar de condiciones de almacenamiento, las moléculas de proteína se disuelven lentamente, liberando el polipéptido de Proteína A activo y/o incrementando la actividad de Proteína A. La velocidad de disolución se controla, por ejemplo, mediante uno o más de los siguientes factores: el grado de reticulación, el tiempo de exposición de los cristales de proteína al agente de reticulación, la velocidad de adición del agente de reticulación a los cristales de proteína, la naturaleza del reticulador, la longitud de cadena del reticulador, el pH, la temperatura, la presencia de reactivos de sulfhidrido como cisteína, glutatona, el área superficial de los cristales de proteína reticulados, el tamaño de los cristales de proteína reticulados, y la forma de los cristales de proteína reticulados.

20 La reticulación se puede lograr usando un o una combinación de una amplia variedad de agentes de reticulación, incluyendo un agente multifuncional, de forma simultánea (en paralelo) o secuencial. Al exponerse a un activador en el entorno que los rodea, o durante un período de tiempo dado, las reticulaciones entre los cristales de proteína reticulados con tales agentes de reticulación multifuncionales disminuyen o se debilitan, lo que conduce a la disolución de la proteína o a la liberación de la actividad. Alternativamente, las reticulaciones se pueden romper en el punto de unión, lo que conduce a la disolución de la proteína o a la liberación de actividad. Véanse las patentes U.S. 5.976.529 y 6.140.475.

25 En algunas realizaciones, el agente de reticulación es un agente de reticulación multifuncional que tiene al menos 2, 3, 4, 5 o más restos activos. En diversas realizaciones, el agente se puede seleccionar de glutaraldehído, succinaldehído, octanodialdehído, glioxal, ditiobis(propionato de succinimidilo), 3,3' ditiobis(propionato de sulfosucinimidilo), 3,3'-ditiobispropionimidato de dimetilo·HCl, 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo, hexametildiamina, diaminoctano, etilendiamina, anhídrido succínico, anhídrido fenilglutárico, salicilaldehído, acetimidato, formalina, acroleína, semialdehído succínico, butiraldehído, dodecilaldehído, gliceraldehído y *trans*-oct-2-enal.

30 Otros agentes de reticulación multifuncionales adicionales incluyen halotriazinas, *por ejemplo* cloruro cianúrico; halopirimidinas, *por ejemplo* 2,4,6-tricloro/bromo-pirimidina; anhídridos o haluros de ácidos mono- o dicarboxílicos alifáticos o aromáticos, *por ejemplo* anhídrido maleico, cloruro de (met)acrilóilo, cloruro de cloroacetilo; compuestos de N-metilol, *por ejemplo* N-metilol cloroacetamida; diisocianatos o diisotiocianatos, *por ejemplo* fenilen-1,4-diisocianato y aziridinas. Otros agentes de reticulación incluyen epóxidos, tales como, por ejemplo, diepóxidos, triepóxidos y tetraepóxidos. En una realización, el agente de reticulación es glutaraldehído, un agente bifuncional, y el glutaraldehído se usa solo o en secuencia con un epóxido. También se pueden usar otros reactivos de reticulación (véase, por ejemplo, el catálogo de 1996 de Pierce Chemical Company), de forma simultánea (en paralelo) o secuencial con agentes de reticulación reversibles, tales como los descritos más abajo.

35 De acuerdo con una realización alternativa de esta invención, la reticulación se puede llevar a cabo usando agentes de reticulación reversibles, en paralelo o de forma secuencial. Los cristales de proteína reticulados resultantes se caracterizan por un ligador multifuncional reactivo, en el que está incorporado un activador como grupo independiente. La funcionalidad reactiva está implicada en el enlazamiento entre sí de las cadenas laterales de aminoácidos reactivas en una proteína, y el activador consiste en un enlace que se puede romper alterando una o más condiciones del entorno circundante (*por ejemplo*, pH, presencia de agente reductor, temperatura, o actividad de agua termodinámica).

40 El agente de reticulación puede ser homofuncional o heterofuncional. La funcionalidad (o resto) reactiva se puede elegir, *por ejemplo*, de uno de los siguientes grupos funcionales (en los que R, R', R'' y R''' pueden ser grupos alquilo, arilo o hidrógeno):

- I. Dadores de acilo reactivos, tales como, *por ejemplo*: ésteres de carboxilato RCOOR', amidas RCONHR', acilazidas RCON₃, carbodiimidias R-N=C=N-R', ésteres de N-hidroxiimida RCO-O-NR', imidoésteres R-C=NH₂⁺(OR'), anhídridos RCO-O-COR', carbonatos RO-CO-O-R', uretanos RNHCONHR', haluros de ácidos RCOHal (en los que Hal = un halógeno), acilhidrazidas RCONNR'R'', y O acilisoureas RCO-O-C=NR'(-NR''R''').
- 5 II. Grupos carbonilo reactivos, tales como, *por ejemplo*: aldehídos RCHO y cetonas RCOR', acetales RCO(H₂)R' y cetales RR'CO₂R'R'' (los grupos funcionales que contienen carbonilo reactivo conocidos por los expertos en la técnica de inmovilización y reticulación de proteínas se describen en la bibliografía (Pierce Catalog and Handbook, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill. (1994); S.S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1991));
- 10 III. Dadores de alquilo o arilo, tales como, *por ejemplo*: haluros de alquilo o arilo R-Hal, azidas R-N₃, ésteres de sulfato RSO₃R', ésteres de fosfato RPO(OR'₃), sales de alquiloxonio R₃ O⁺, sulfonio R₃ S⁺, ésteres de nitrato RONO₂, aceptores de Michael RCR'=C'''COR'', fluoruros de arilo ArF, isonitrilos RN+=C-, haloaminas R₂N-Hal, alquenos y alquinos;
- 15 IV. Grupos que contienen azufre, tales como, *por ejemplo*: disulfuros RSSR', sulfhidrilos RSH y epóxidos R₂C-°CR'₂; y
- V. Sales, tales como, *por ejemplo*: sales de alquil- o aril-amonio R₄N⁺, carboxilato RCOO⁻, sulfato ROSO₃⁻, fosfato ROPO₃⁻, y aminas R₃N.

Los agentes de reticulación reversibles comprenden, por ejemplo, un activador. Los activadores incluyen alquilo, arilo, u otra cadena con un grupo activante que puede reaccionar con la proteína a reticular. Esos grupos reactivos pueden ser cualquiera de una variedad de grupos, tales como aquellos susceptibles de desplazamiento nucleófilo, de radicales libres o electrófilo, incluyendo haluros, aldehídos, carbonatos, uretanos, xantanos y epóxidos, entre otros. Por ejemplo, los grupos reactivos pueden ser lábiles a ácidos, bases, fluoruros, enzimas, reducción, oxidación, tioles, metales, fotólisis, radicales o calor.

En T.W. Green, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons (Eds.) (1981) se describen otros ejemplos de agentes de reticulación reversibles. En un reticulador adecuado para producir cristales de proteína reticulados capaces de una solubilización controlada, reversible, se puede incorporar cualquier variedad de estrategias para la protección reversible de grupos. En la revisión de Waldmann de esta materia, en Angewante Chemie Int. Ed. Engl., 35:2056 (1996), se citan diversos enfoques.

Otros tipos de agentes de reticulación reversibles son reticuladores que contienen enlaces de disulfuro. El activador que rompe los enlaces de reticulación formados por estos agentes de reticulación es la adición de un agente reductor, tal como cisteína, al entorno de los cristales de proteína reticulados. En el Pierce Catalog and Handbook (1994-1995) se describen ejemplos de agentes de reticulación de disulfuro. En la patente US nº 6.541.606 se describen ejemplos de tales reticuladores y métodos.

Además, también se pueden usar agentes de reticulación que producen una reticulación entre restos de hidratos de carbono o entre un resto de hidrato de carbono y un aminoácido.

La concentración del agente de reticulación puede ser de alrededor de 0,01% a 20%, alrededor de 0,02% a 10%, o alrededor de 0,05% a 5% p/v en disolución. Normalmente, el agente de reticulación es alrededor de 0,5% o alrededor de 1% p/v. Por ejemplo, la concentración de agente de reticulación puede ser, por ejemplo, de alrededor de 0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,075%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 3,5%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, o 20% p/v en disolución. Puede ser necesario cambiar los tampones antes de la reticulación. Opcionalmente, los cristales, incluyendo CLPCs, se pueden liofilizar o formular de otro modo.

Los cristales, incluyendo los cristales reticulados descritos aquí, son útiles en el tratamiento y métodos *ex vivo* para reducir los niveles de IgG de complejos inmunitarios circulantes, tales como en púrpura trombocitopénica inmunitaria. Los cristales de Proteína A también son útiles en métodos relacionados con procedimientos industriales (*por ejemplo*, purificación de anticuerpos monoclonales, purificación de anticuerpos policlonales, purificación de inmunoglobulinas, IgGs y sus subtipos, fragmentos Fab, anticuerpos monocatenarios, etc., de diversas fuentes, ya sea en formato de columna o impregnados en una membrana o en polímeros o revestimiento, o inmovilizados sobre un soporte. Los cristales descritos aquí se pueden aplicar a tales usos, en base a una o más propiedades de los cristales de Proteína A estabilizados descritos anteriormente.

Secado de cristales-CLPCs cristales de Proteína A. Los cristales de Proteína A se secan por eliminación de agua, del disolvente orgánico o del polímero líquido por medios de secado que incluyen secado con N₂, aire o gases inertes, secado en estufa de vacío, liofilización, lavado con un disolvente orgánico volátil seguido de evaporación del disolvente, evaporación en campana extractora, secado en bandeja, secado en lecho fluidizado, secado por pulverización, secado en vacío, o secado por rodillo. Normalmente, el secado se logra cuando los cristales se convierten en un polvo que fluye libremente. El secado se puede llevar a cabo haciendo pasar una corriente de gas sobre los cristales húmedos. El gas se puede seleccionar del grupo que consiste en: nitrógeno, argón, helio, dióxido de carbono, aire o combinaciones de los mismos.

En principio, los cristales secos se pueden preparar por liofilización. Sin embargo, esta técnica implica un enfriamiento rápido del material y sólo se puede aplicar a productos resistentes a la congelación. En una realización, la solución acuosa que contiene una Proteína A cristalina CLPC se congela primero a una temperatura entre -40 y -50°C, seguido de la eliminación a vacío.

- 5 Producción de cristales de CLPC de Proteína A o formulaciones o composiciones que comprenden tales cristales. En un aspecto, se describen cristales de CLPC de Proteína A, o formulaciones o composiciones que comprenden tales cristales reticulados. Tales composiciones se pueden preparar de acuerdo con el siguiente procedimiento:

10 En primer lugar, se cristaliza la Proteína A. A continuación, se añaden directamente al licor madre excipientes o ingredientes seleccionados de azúcares, alcoholes de azúcar, agentes para aumentar la viscosidad, agentes humectantes o solubilizantes, sales tampón, agentes emulsionantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes y agentes de revestimiento. Alternativamente, se elimina el licor madre, tras lo cual los cristales se suspenden en una disolución de excipiente durante un mínimo de 1 hora hasta un máximo de 24 horas. La concentración de excipiente está típicamente entre alrededor de 0,01 y alrededor de 10% (p/p). La concentración de ingrediente está entre alrededor de 0,01 y alrededor de 90% (p/p). La concentración de cristal está entre alrededor de 0,01 y
15 alrededor de 99% (p/p).

Después, el licor madre se elimina de la suspensión de cristales mediante filtración o centrifugación. A continuación, los cristales se lavan opcionalmente con disoluciones de alrededor de 50 a 100% (p/p) de uno o más disolventes orgánicos, por ejemplo etanol, metanol, isopropanol o acetato de etilo, a temperatura ambiente o a temperaturas entre alrededor de -20°C y alrededor de 25°C.

- 20 Los cristales se secan entonces haciendo pasar una corriente de nitrógeno, aire o gas inerte sobre los mismos. Alternativamente, los cristales se secan mediante secado por aire, por pulverización, liofilización o secado en vacío. El secado se lleva a cabo durante un mínimo de alrededor de 1 hora y un máximo de alrededor de 72 horas después del lavado, hasta que el contenido de humedad del producto final esté por debajo de alrededor de 10% en peso, de forma especialmente preferible, por debajo de alrededor de 5% en peso. Finalmente, se puede llevar a cabo una
25 micronización (reducción del tamaño) de los cristales, en caso necesario.

De acuerdo con una realización de esta invención, cuando se preparan cristales de CLPC de Proteína A, o formulaciones o composiciones contienen tales cristales, durante la cristalización no se añaden potenciadores, tales como agentes tensioactivos. Los excipientes o ingredientes se añaden al licor madre después de la cristalización, a una concentración de entre alrededor de 1 y alrededor de 10% (p/p), alternativamente a una concentración entre
30 alrededor de 0,1 y alrededor de 25% (p/p), alternativamente a una concentración entre alrededor de 0,1 y alrededor de 50% (p/p). El excipiente o ingrediente se incubaba con los cristales en el licor madre durante alrededor de 0,1 a alrededor de 3 horas, alternativamente la incubación se lleva a cabo durante alrededor de 0,1 a alrededor de 12 horas, alternativamente la incubación se lleva a cabo durante alrededor de 0,1 a alrededor de 24 horas.

35 En otra realización de esta invención, el ingrediente o excipiente se disuelve en una disolución diferente del licor madre, y los cristales se eliminan del licor madre y se suspenden en la disolución de ingrediente o excipiente. Las concentraciones del ingrediente o excipiente y los tiempos de incubación son los mismos a los descritos anteriormente.

Otra ventaja de la presente invención es que los cristales de CLPC de Proteína A, o sus formulaciones, que están encapsulados en vehículos poliméricos para formar composiciones que comprenden microesferas se pueden secar
40 por liofilización. La liofilización o criodesecación permite separar el agua de la composición. La composición de cristales de CLPC de Proteína A se congela primero y después se coloca en alto vacío. En vacío, el agua cristalina sublima, abandonando la composición de cristales de CLPC de Proteína A, que contiene únicamente el agua unida firmemente. Además, este procesamiento estabiliza la composición y permite un almacenamiento y transporte más fáciles a temperaturas ambiente encontradas típicamente.

45 El secado por pulverización permite separar agua de la preparación cristalina. Es sumamente adecuado para la producción continua de sólidos secos en forma de polvo, granulado o aglomerado a partir de materias primas líquidas, como disoluciones, emulsiones y suspensiones bombeables. El secado por pulverización implica la atomización de una materia prima líquida en una pulverización de pequeñas gotitas, y poner en contacto las
50 pequeñas gotitas con aire caliente en una cámara de secado. Las pulverizaciones se producen mediante atomizadores giratorios (de rueda) o de boquilla. La evaporación de humedad de las gotitas y la formación de partículas secas transcurren en condiciones de temperatura y corriente de aire controladas. Para las operaciones de secado por pulverización se requieren temperaturas relativamente altas. No obstante, en general los daños causados por calor a los productos son pequeños, debido a un efecto de enfriamiento por evaporación durante el período de secado crítico y porque el tiempo posterior de exposición a altas temperaturas del material seco puede ser muy corto. El polvo se descarga de forma continua de la cámara de secado. Las condiciones de funcionamiento y el diseño de la secadora se seleccionan en función de las características de secado del producto y de la especificación del polvo. El secado por pulverización es un procedimiento ideal cuando el producto final ha de cumplir unas normas de calidad precisas en cuanto a la distribución de tamaños de partículas, contenido de
55 humedad residual, densidad aparente y forma de las partículas.

60

El CLPC de Proteína A usado según esta invención se puede combinar con un excipiente. De acuerdo con esta invención, el "excipiente" actúa como una carga o como una combinación de cargas usada en composiciones farmacéuticas. Los ejemplos de excipientes se describen en Handbook of Pharmaceutical Excipients, publicado conjuntamente por la American Pharmaceutical Association y la Pharmaceutical Society of Great Britain, y más abajo se exponen ejemplos adicionales. Los excipientes preferidos incluidos en esta categoría son: sales de 1) aminoácidos tales como glicina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, asparagina, glutamina, prolina; 2) hidratos de carbono, por ejemplo monosacáridos tales como glucosa, fructosa, galactosa, manosa, arabinosa, xilosa, ribosa; 3) disacáridos, tales como lactosa, trehalosa, maltosa, sucrosa; 4) polisacáridos, tales como maltodextrinas, dextranos, almidón, glicógeno; 5) alditoles, tales como manitol, xilitol, lactitol, sorbitol; 6) ácido glucurónico, ácido galacturónico; 7) ciclodextrinas, tales como metil ciclodextrina, hidroxipropil-β-ciclodextrina y similares; 8) moléculas inorgánicas, tales como cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro magnésico, fosfatos de sodio y potasio, ácido bórico, carbonato de amonio y fosfato de amonio; 9) moléculas orgánicas, tales como acetatos, citrato, ascorbato, lactato; 10) agentes emulsionantes o solubilizantes/estabilizantes como goma arábiga, dietanolamina, monoestearato de glicerilo, lecitina, monoetanolamina, ácido oleico, alcohol oleílico, poloxámero, polisorbatos, laurilsulfato de sodio, ácido esteárico, monolaurato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, y otros derivados de sorbitán, polioxil derivados, cera, derivados de polioxietileno, derivados de sorbitán; y 11) reactivos que incrementan la viscosidad, como agar, ácido alginico y sus sales, goma guar, pectina, polialcohol vinílico, polióxido de etileno, celulosa y sus derivados, carbonato de propileno, polietilenglicol, hexilenglicol, tiloxapol. Un grupo preferido adicional de excipientes incluye sacarosa, trehalosa, lactosa, sorbitol, lactitol, inositol, sales de sodio y potasio tales como acetato, fosfatos, citratos, borato, glicina, arginina, polióxido de etileno, polialcohol vinílico, polietilenglicol, hexilenglicol, metoxi polietilenglicol, gelatina, hidroxipropil-β-ciclodextrina, polilisina, poliarginina.

En una realización de esta invención, el excipiente se selecciona del grupo que consiste en: sales, alcoholes, hidratos de carbono, proteínas, lípidos, tensioactivos, polímeros y poliaminoácidos. En otra realización, el excipiente se selecciona del grupo que consiste en: protamina, polialcohol vinílico, ciclodextrinas, dextranos, poliaminoácidos, tales como poliarginina, polilisina y poliglutamato, polietilenglicol y dendrímeros, polímeros tales como policarbofil, alginato.

Composiciones. Los cristales de Proteína A, incluyendo los cristales reticulados, se proporcionan como una composición, tal como una composición farmacéutica (véase, *por ejemplo*, la patente U.S. nº 6.541.606, que describe formulaciones y composiciones de cristales de proteína). Las composiciones farmacéuticas que comprenden cristales reticulados de Proteína A incluyen cristales reticulados de Proteína A con uno o más ingredientes o excipientes, incluyendo, pero sin limitarse a, azúcares y polímeros biocompatibles.

El CLPC de Proteína A se puede administrar como un cristal en una composición en cualquiera de una variedad de formas de sales fisiológicamente aceptables, y/o con un vehículo y/o aditivo farmacéutico aceptable como parte de una composición farmacéutica. Los expertos en la técnica conocen bien las formas de sales fisiológicamente aceptables y las técnicas y excipientes de formulación farmacéutica estándar (véase, *por ejemplo*, Physician's Desk Reference (PDR) 2003, 57ª edición, Medical Economics Company, 2002; y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, editores Gennado et al., 20ª edición, Lippincott, Williams & Wilkins, 2000). Para los fines de esta solicitud, "formulaciones" incluye "formulaciones de cristales". Otros ingredientes y excipientes útiles para las composiciones de cristales de Proteína A incluyen los siguientes:

Polímeros biocompatibles. Los polímeros biocompatibles son polímeros que son no antigénicos (cuando no se utilizan como adyuvantes), no carcinógenos, no tóxicos y que no son inherentemente incompatibles de otro modo con los organismos vivos, y que pueden ser usados en las composiciones de cristales de Proteína A descritas aquí. Los ejemplos incluyen: poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptidos), poli(ésteres) tales como poli(ácido láctico) o PLA, poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(β-hidroxi butirato), poli(caprolactona) y poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil)-metacrilamida), poli[(organo)fosfaceno], poli(ortoésteres), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico - alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, sus mezclas y copolímeros.

Polímeros biodegradables, *es decir*, polímeros que se degradan por hidrólisis o solubilización se pueden incluir, en las composiciones de cristales de Proteína A. La degradación puede ser heterogénea (se produce principalmente en la superficie de la partícula) u homogénea (la degradación se produce uniformemente por toda la matriz polimérica).

En las composiciones de cristales de Proteína A se pueden incluir ingredientes tales como uno o más excipientes, o ingredientes o excipientes farmacéuticos. Un ingrediente puede ser un ingrediente inerte o activo.

La presente invención es aplicable a IgGs en general, independientemente de la fuente. Los IgGs preferidos para los fines de esta invención son las clases de IgG humanas y de ratón. Las proteínas a partir de las cuales se pueden separar las especies de interés son otras inmunoglobulinas, tales como, por ejemplo, IgM e IgE, y otras proteínas tales como, por ejemplo, albúminas. Se sabe que la afinidad de unión de estas proteínas por la proteína A es mucho menor que la de IgGs.

Se puede usar cualquier sal inorgánica que sea soluble en un medio acuoso. Los ejemplos incluyen haluros y

- sulfatos de metales alcalinos y alcalino-térreos. Los iones cargados positivamente, tales como amonio, se pueden sustituir por iones metálicos. La sal también debe ser no reactiva con respecto a las inmunoglobulinas, la Proteína A o cualquier soporte al que esté unida la Proteína A. La concentración de sal puede oscilar de alrededor de 0,5 M hasta el límite de solubilidad, preferiblemente de alrededor de 1,0 M a alrededor de 4,0 M. El pH exacto de la disolución no es crítico, y puede variar ampliamente dentro del intervalo desde aproximadamente neutro hasta levemente alcalino. De este modo, el pH puede ser mayor o igual a aproximadamente 7,0, preferiblemente de alrededor de 8,5 a alrededor de 9,5.
- La sal se usa preferiblemente como parte de una disolución tampón, el efecto tamponante creado por la propia sal o por un componente separado en la mezcla. Se pueden usar tampones convencionales, seleccionados apropiadamente para lograr el pH deseado.
- Para los fines de inmovilización, la Proteína A se cristaliza y reticula sin ningún soporte sólido, tal como el material de empaquetamiento en una columna de cromatografía de afinidad.
- Cuando la presente invención se usa para potenciar la separación en cromatografía de afinidad, es preferible equilibrar el empaquetamiento de la columna mediante lavados repetidos con una disolución tampón que contiene una concentración elevada de sal, y también diluir la mezcla de la muestra en la misma disolución tampón antes de añadirla a la columna. La dilución también puede variar ampliamente, aunque se prefieren diluciones que oscilan de alrededor de 1:1 a alrededor de 1:20. A medida que la disolución tampón pasa a través de la columna, las proteínas que no se unen serán llevadas con la disolución tampón, que las separa de ese modo de las inmunoglobulinas unidas. La recuperación de las inmunoglobulinas se logra entonces mediante elución con un tampón ácido, que tiene preferiblemente un pH que oscila de alrededor de 2,0 a alrededor de 5,0, más preferiblemente de alrededor de 2,5 a alrededor de 4,0.
- La naturaleza de la columna no es crítica y puede variar ampliamente, oscilando desde una columna abierta hasta una columna a presión. La fuerte unión inherente en la invención permite que se logre una separación eficaz mediante el uso de una columna abierta.
- Una “muestra que contiene una proteína diana”, como se usa en esta memoria descriptiva, se refiere a cualquier muestra que contiene la proteína diana, ya sea derivada de forma natural o preparada de forma artificial. La muestra puede incluir mezclas de diferentes líquidos, un líquido y un sólido, o diferentes sólidos. Los ejemplos de una muestra que contiene una proteína diana pueden incluir sangre, suero, fluido ascítico, leche, una muestra tisular, un cultivo celular, un lisado celular, o el sobrenadante de un cultivo celular.
- “Soporte”, como se usa en esta memoria descriptiva, se refiere a cualquier objeto al que se puede inmovilizar una Proteína A para obtener un medio de cromatografía por afinidad, independientemente de su forma o del material a partir del que está hecho. Los ejemplos incluyen agarosa, que se usa a menudo en cromatografía de afinidad; celulosa; y poliacrilamida.
- “Medio cromatográfico”, como se usa en esta memoria descriptiva, se refiere a una fase estacionaria usada para la purificación cromatográfica independientemente de su configuración (columna o plana), estado (líquido o sólido), o el material del que está hecha. Los ejemplos habituales de medios cromatográficos usados para purificación de proteínas incluyen una resina de intercambio iónico, una fase estacionaria de afinidad, y una fase estacionaria de permeación en gel.
- “Acoplado”, como se usa en esta memoria descriptiva, se refiere al contacto directo así como a la disposición de un gen o proteína ligadora entre dos o más tipos de genes o proteínas. También incluye el acoplamiento a través de enlaces covalentes o no covalentes.
- “Proteína diana”, como se usa en esta memoria descriptiva, se refiere a cualquier proteína a purificar. Un ejemplo de una proteína diana puede ser un anticuerpo.
- Una “proteína de fusión” se refiere aquí a cualquier combinación de dos o más polipéptidos distintos. La proteína de fusión incluye una combinación de dos o más polipéptidos distintos en la que los dos o más polipéptidos están enlazados covalentemente. La proteína de fusión incluye una combinación de dos o más polipéptidos distintos, en la que los dos o más polipéptidos distintos no están enlazados covalentemente. Los dos o más polipéptidos distintos pueden estar directamente en contacto entre sí sin ningún mediador. Los dos o más polipéptidos distintos pueden estar mediados por un mediador, tal como un péptido ligador.
- El método o uso descrito aquí usa la especificidad de unión elevada entre una Proteína A y una proteína diana, tal como un anticuerpo.
- En una realización, el método incluye poner en contacto una muestra que contiene una proteína diana con un soporte que tiene inmovilizado en él una Proteína A reticulada cristalina, en el que la proteína diana es un anticuerpo, y el CLPC de Proteína A tiene afinidad de unión específica por el anticuerpo, y en el que el contacto se realiza en condiciones de manera que la Proteína A se une al anticuerpo; eliminar componentes de la muestra que no están unidos; y eliminar entonces la proteína diana/anticuerpo del soporte. En algunas realizaciones, la muestra

es un lisado celular, un cultivo celular, el sobrenadante de un cultivo celular, o un fluido biológico que contiene la proteína diana. En algunas realizaciones, el soporte que tiene inmovilizado en él una Proteína A cristalina reticulada se configura como una columna de cromatografía de afinidad.

5 En el método y columna para la purificación de proteínas descrita aquí, se puede usar una columna desechable. La columna desechable puede tener un diámetro de alrededor de 0,1 a alrededor de 1,0 mm, alrededor de 0,3 a alrededor de 0,7 mm, o alrededor de 0,5 mm. La columna se puede colocar en un tubo de ensayo de vidrio de alrededor de 16 x 125 mm. En una realización, una columna desechable que tiene el diámetro de 0,5 mm se coloca en un tubo de ensayo de vidrio de 16 x 125 mm. El medio cromatográfico, por ejemplo CLPC de Proteína A, se puede empaquetar en la columna según cualquier método conocido en la técnica. En una realización que usa una columna desechable, se añade a la columna un volumen suficiente de tampón/agua desgasificados, para llenarla hasta la porción del depósito (boca ancha), y después se eliminan cualesquiera burbujas de aire de la columna. Después de eso, el gel (CLPC de Proteína A) se puede empaquetar en la columna con suspensión de gel al 50% desgasificado, y disolución tampón desgasificada (o agua) a temperatura ambiente. Se puede añadir un volumen suficiente de suspensión de gel desgasificada para obtener el volumen de gel sedimentado deseado. Se puede dejar que el gel sedimente en la columna durante al menos 30 minutos. La columna empaquetada se puede almacenar y usar a 4°C.

La eliminación de la proteína diana del soporte puede comprender eluir la proteína diana a partir del soporte. La elución de la proteína diana se puede realizar mediante elución a un pH que reduce la afinidad de unión entre el CLPC de Proteína A y el anticuerpo, de tal manera que la proteína diana/anticuerpo se elimina del soporte (CLPC de Proteína A).

La primera etapa en el procedimiento de la presente invención requiere un tampón que tiene un pH en el intervalo de alrededor de pH 7,0 a pH 10, y una combinación de cationes monovalentes y aniones polibásicos en una concentración de alrededor de 0,01 M a 2 M. Para proporcionar el pH deseado, se puede usar cualquier tampón. Por ejemplo, se puede usar tampón de fosfato, tampón de glicina, tampón de borato o tampón de tris. La concentración de tampón debería estar en el intervalo de alrededor de 0,01 M a 0,25 M. Además, se pueden añadir al tampón, en el intervalo de concentraciones de alrededor de 0,05 M a 2,0 M, sales de NaCl, KCl, cloruro de tetrametilamonio (TMAC), cloruro de tetraetilamonio (TEAC), cloruro de tetrapropilamonio y cloruro de tetrabutilamonio, etc.

30 Cuando los cationes monovalentes son iones de potasio o iones de sodio y los aniones polibásicos son iones fosfato, los iones de potasio y los iones fosfato se pueden proporcionar mediante el uso de fosfato de potasio, ya sea en forma de fosfato tripotásico, K_3PO_4 , hidrogenofosfato dipotásico, K_2HPO_4 , o dihidrogenofosfato monopotásico, KH_2PO_4 , puesto que el pH del medio controla la proporción de los diversos iones fosfato que están presentes. Los iones de potasio y los iones fosfato deberían de estar presentes en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,6 M a 1,75 M. Se ha encontrado especialmente satisfactoria una concentración de alrededor de 1,0 M a 1,5 M.

35 Otras combinaciones de cationes monovalentes y aniones polibásicos que tienen solubilidades adecuadas a las concentraciones elevadas usadas en la presente invención incluyen fosfatos de amonio en concentraciones de alrededor de 1,0 M a 1,5 M, sulfatos de amonio en concentraciones de alrededor de 1,0 M a 1,5 M, y sulfatos de sodio en concentraciones de alrededor de 1,0 M a 1,25 M. Igualmente se pueden usar otras combinaciones, en tanto que las sales no precipiten a las concentraciones usadas.

40 Como se señala anteriormente, el adsorbente (CLPC de Proteína A) se usa preferiblemente en una columna para facilitar el contacto con las inmunoglobulinas a purificar. Antes de la aplicación del medio que contiene las inmunoglobulinas impuras a la columna, la columna que contiene CLPC de Proteína A se equilibra con varios volúmenes de lecho de tampón que contienen la combinación de cationes monovalentes y aniones polibásicos a concentraciones en el intervalo de alrededor de 0,01 M a 4 M. Esto asegura que el entorno es óptimo para la unión de las inmunoglobulinas a la columna. El medio que contiene las inmunoglobulinas a purificar, tal como un suero inmunitario u otra fuente de inmunoglobulinas, se mezcla con el tampón que contiene la combinación de cationes monovalentes y aniones polibásicos. La mezcla resultante se aplica entonces a la columna, dando como resultado la adsorción de las inmunoglobulinas a la columna. La columna se lava entonces con tampón adicional que contiene la combinación de cationes monovalentes y aniones polibásicos, a fin de eluir de la columna impurezas que no están adsorbidas fuertemente a la columna. Por otro lado, las inmunoglobulina están fuertemente adsorbidas a la columna debido a la afinidad potenciada del adsorbente por las inmunoglobulinas como resultado de la presencia del tampón que contiene la combinación de cationes monovalentes y aniones polibásicos. Tras eliminar las impurezas deseadas mediante lavado con la misma disolución tampón, las inmunoglobulinas purificadas se eluyen de la columna por medio de un tampón que tiene un pH ácido, a saber, un pH en el intervalo de alrededor de pH 2,0 a pH 6,0. A pH 6,0, se eluye una parte de las inmunoglobulinas, principalmente la fracción IgG_1 . A medida que el pH se reduce, se eluye el resto de las inmunoglobulinas, incluyendo las fracciones IgG_{2a} e IgG_{2b} . Las inmunoglobulinas se pueden eluir usando un tampón de pH 2,0, que es eficaz para eluir todas las inmunoglobulinas. Sin embargo, si se desea, una fracción de las inmunoglobulinas se puede eluir a pH 6,0. Si así se desea, otras diversas fracciones se pueden eluir reduciendo el pH entre pH 6,0 y pH 2,0. Al reducir el pH por etapas, es posible aislar fracciones purificadas de inmunoglobulinas que contienen inmunoglobulinas específicas según se desea. Para la elución, se puede usar cualquier tampón. Por ejemplo, para este fin se puede usar un tampón de ácido acético-acetato o tampón de glicina.HCl. Se puede usar una concentración de tampón en el intervalo de alrededor de 0,01 M a 0,25 M. Se

prefiere especialmente una concentración de tampón de alrededor de 0,1 M a 0,2 M.

Las inmunoglobulinas o sus fracciones se pueden unir a una columna corta de CLPC de Proteína A cuando se compara con la Proteína A inmovilizada unida a soporte tal como por ejemplo agarosa. Las inmunoglobulinas aisladas o sus fracciones se pueden recuperar con rendimientos que ascienden tanto como a noventa por ciento (90%). Incluso la unión obtenida usando las técnicas más sofisticadas previamente disponibles se puede mejorar tanto como 2 a 10%.

En ciertas realizaciones, la muestra de recuperación primaria se somete a cromatografía de afinidad para purificar adicionalmente el anticuerpo de interés lejos de HCPs. En ciertas realizaciones, el material cromatográfico es capaz de unirse selectiva o específicamente al anticuerpo de interés. Los ejemplos no limitantes de tal material cromatográfico incluyen: Proteína A, Proteína G, Proteína L. En realizaciones específicas, la etapa de cromatografía de afinidad implica someter la muestra de recuperación primaria a una columna que comprende una resina de Proteína A adecuada. La resina de Proteína A es útil para la purificación por afinidad y aislamiento de una variedad de isotipos de anticuerpos, particularmente IgG₁, IgG₂, e IgG₄.

Un ejemplo no limitante de una columna adecuada empaquetada con CLPC de Proteína A es una columna de alrededor de 1,0 cm de diámetro x alrededor de 21,6 cm de longitud (volumen del lecho ~ 17 ml). Este tamaño de columna se puede usar para purificaciones a pequeña escala, y se puede comparar con otras columnas usadas para aumentos de escala. Por ejemplo, para purificaciones más grandes, se puede usar una columna de 20 cm x 21 cm cuyo volumen de lecho es alrededor de 6,6 l. Independientemente de la columna, la columna se puede empaquetar usando un CLPC de Proteína A.

En ciertas realizaciones será ventajoso identificar la capacidad de unión dinámica (DBC) de la resina de Proteína A, a fin de particularizar la purificación al anticuerpo particular de interés. Por ejemplo, pero no a título de limitación, la DBC de una columna de CLPC de Proteína A se puede determinar mediante una estrategia de carga de caudal individual o de carga de flujo dual. La carga de caudal individual se puede evaluar a una velocidad de alrededor de 300 cm/h durante todo el período de carga. La estrategia de carga de caudal dual se puede determinar cargando la columna hasta alrededor de 35 mg de proteína/ml de resina a una velocidad lineal de alrededor de 300 cm/h, reduciendo entonces la velocidad lineal hasta la mitad para permitir un mayor tiempo de residencia de la última porción de la carga.

En ciertas realizaciones, la columna de Proteína A se puede equilibrar con un tampón adecuado antes de la carga de la muestra. Un ejemplo no limitante de un tampón adecuado es un tampón de PBS o Tris/NaCl, pH de alrededor de 7,2-7,4. Un ejemplo no limitante de tales condiciones de equilibrado adecuadas es tampón de PBS pH 7,4 o Tris 25 mM, NaCl 100 mM, pH de alrededor de 7,2. Tras este equilibrado, la muestra se puede cargar sobre la columna. Tras la carga de la columna, la columna se puede lavar una o múltiples veces usando, por ejemplo, el tampón de equilibrado. Se pueden emplear otros lavados, incluyendo lavados que emplean diferentes tampones, antes de eluir la columna. Por ejemplo, la columna se puede lavar usando uno o más volúmenes de columna de ácido cítrico/citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M a pH de alrededor de 6,0. A este lavado le pueden seguir opcionalmente uno o más lavados usando el tampón de equilibrado. La columna de Proteína A se puede eluir entonces usando un tampón de elución apropiado. Un ejemplo no limitante de un tampón de elución adecuado es un tampón de ácido acético/NaCl, pH de alrededor de 3,5. Las condiciones adecuadas son, por ejemplo, ácido acético 0,1 M, pH de alrededor de 3,5, o tampón de glicina.HCl 0,2 M, pH 2,0. El eluato se puede monitorizar usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede seguir la absorbancia a OD₂₈₀. El eluato de la columna se puede recoger partiendo de una deflexión inicial de alrededor de 0,5 UA hasta una lectura de alrededor de 0,5 UA en la cola del pico de elución. La fracción o fracciones de elución de interés se pueden preparar entonces para procesamiento posterior. Por ejemplo, la muestra recogida se puede valorar hasta un pH de alrededor de 5,0 usando Tris (por ejemplo, 1,0 M) a un pH de alrededor de 10. Opcionalmente, esta muestra valorada se puede filtrar y procesar posteriormente.

La presente invención proporciona una composición, que se usa para y da como resultado materiales impregnados usados en una variedad de aplicaciones que incluyen, por ejemplo, la eliminación de inmunoglobulinas de sangre, plasma, suero, cultivo celular durante la purificación o inmunoprecipitación, y métodos para producir y usar la misma. Tales membranas impregnadas de proteína también se pueden usar en aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y otras aplicaciones industriales.

En una realización, se usan composiciones de la presente invención, incluyendo membranas impregnadas con un cristal de proteína A reticulado. En una realización, las membranas pueden estar impregnadas adicionalmente mediante proteínas reticuladas que pueden incluir proteínas capaces de eliminar anticuerpos o similares de suero, plasma, sangre, cultivo celular, tales como Proteína A, Proteína G, Proteína L, proteínas similares o sus combinaciones.

En una realización, se usa la composición de la presente invención que da como resultado una membrana polimérica, impregnada con los cristales de proteína A reticulados, solos o en combinación con otros cristales de proteína reticulados, tales como Proteína G o Proteína L. Se cree que el uso de membranas impregnadas con CLPC de Proteína A proporcionará un número de beneficios sobre las tecnologías de inmovilización actualmente

disponibles, que incluyen, por ejemplo: 1) mejor contención de la Proteína A sin ninguna lixiviación; 2) tamaño reducido del cartucho/columna, dando como resultado una mejor facilidad de uso; 3) facilidad de uso durante la fabricación del cartucho/columna; y 4) mayor seguridad sobre el sistema existente (debido a una mejor contención de la Proteína A en el cartucho).

5 Las membranas impregnadas de proteína reticulada de la presente invención se pueden obtener de una variedad de formas adecuadas. En general, primero se prepara una disolución de moldeo de membrana a base de polímero, y después se mezcla con la cantidad y tipos deseados de cristales de proteína reticulados. Se debería apreciar que la disolución de moldeo de la membrana se puede obtener a partir de cualesquiera materiales adecuados a base de polímeros. Una vez formada y mezclada con la proteína reticulada, la disolución de moldeo de la membrana se aplica a un material soporte, por ejemplo, extendiéndola sobre el material soporte, y se somete a una o más secuencias de precipitación y lavado para formar una membrana compuesta que se puede secar subsiguientemente antes del uso.

15 En una realización, la disolución de moldeo está compuesta de un material base polimérico, tal como poliuretano o similar, en un disolvente adecuado que incluye, por ejemplo, 1-metil-2-pirrolidinona ("NMP"), dimetilformamida ("DMF"), similar, o sus combinaciones. La disolución de moldeo también puede incluir otros componentes adicionales, tales como un agente para dar volumen, un agente hidrófilo (por ejemplo, un agente que puede hacer a la membrana más hidrófila), similares, o sus combinaciones. En una realización, el agente para dar volumen puede incluir óxido de circonio, fosfato de circonio, carbono, similar, o sus combinaciones. El agente para dar volumen se puede añadir en una cantidad suficiente para controlar la porosidad de la membrana. El agente para dar volumen se puede añadir en una cantidad de hasta alrededor de 80% del peso seco total de la membrana, preferiblemente alrededor de 50% del peso seco total de la membrana. En una realización, el agente para dar volumen y el cristal de proteína reticulada se añaden en cantidades iguales o al menos cantidades aproximadamente iguales.

En una realización, el agente hidrófilo es polivinilpirrolidona ("PVP"), similar, o sus combinaciones. El agente hidrófilo se puede añadir en cualquier cantidad adecuada para potenciar la naturaleza hidrófila de la membrana.

25 La disolución de moldeo se mezcla entonces con una cantidad adecuada de una Proteína A reticulada. En una realización, el CLPC de Proteína A reticulada se añade a la membrana en una cantidad eficaz para proporcionar un nivel deseado de actividad de unión. En una realización, la membrana está impregnada con alrededor de 3,25 mg/cm² o menos de la proteína reticulada. A este respecto, el cristal de proteína reticulada puede ascender hasta alrededor de 80% o menos del peso de la membrana.

30 La disolución resultante de la membrana se aplica entonces a un soporte, tal como un material de malla sintético, y se sumerge en agua u otro medio adecuado, tal como una mezcla de alcohol isopropílico y agua, preferiblemente una relación 50:50 de alcohol isopropílico ("IPA") a agua. Entonces se puede precipitar en condiciones adecuadas un material compuesto de membrana polimérico. Por ejemplo, se puede añadir una cantidad adecuada de NMP durante la precipitación con agua, para controlar la velocidad de precipitación. A este respecto, la velocidad de precipitación se puede disminuir, dando así como resultado una matriz polimérica porosa de la membrana.

El CLPC de Proteína A de la presente invención se puede administrar a través de un dispositivo extracorpóreo o catéter, tal como para el suministro de CLPC de Proteína A a un paciente. Los catéteres, por ejemplo catéteres urinarios, se pueden revestir con composiciones que contienen cristales de CLPC de Proteína A.

EJEMPLOS

40 Ejemplo 1

INTRODUCCIÓN

Los cristales reticulados (CLPCs) de Proteína A se produjeron para desarrollar un sistema de cromatografía mediante Proteína A innovador, para la purificación de anticuerpos. Los CLPCs de Proteína A ofrecerán las ventajas de actividad de Proteína A muy concentrada, combinada con estabilidad y resistencia química elevadas. La concentración de Proteína A condensada reducirá el tamaño de la columna, el volumen del tampón, y el tiempo de procesamiento. Además, la reticulación de los cristales de Proteína A evitará la lixiviación de la Proteína A durante la cromatografía. En conjunto, esto reducirá el tiempo y coste de la producción de anticuerpos.

Los Ejemplos aquí describen la cristalización (tanto en gotas colgantes como en lotes) y la reticulación de Proteína A recombinante.

50 OBJETO

Para desarrollar cristales de Proteína A reticulados para la purificación de anticuerpos.

EQUIPO Y MATERIALES

- Proteína A recombinante, Repligen Corporation, nº de Catálogo rPA50.

ES 2 530 578 T3

- Proteína A recombinante, Fitzgerald International, nº de Catálogo 30-AP75.
 - Unidad de filtración centrífuga Amicon Ultra-4, Millipore, nº de Catálogo UFC801008.
 - Unidades de filtración de esterilización desechables Nalgene MF75 Serie, 0,2 micrómetros, Fisher Scientific, nº de Catálogo 09-740-36K.
- 5
- Medidor de la conductividad del pH, Denver Instrument, Modelo 220.
 - Cubreobjetos circulares siliconizados: Hampton Research, nº de Catálogo HR3-233.
 - Placas VDX™, Hampton Research, nº de Catálogo HR3-140.
 - Espectrómetro UV-Visible 8453, Agilent Technologies.
 - Sulfato de amonio, Fisher Scientific, nº de Catálogo BP212R-1.
- 10
- Disolución de ácido clorhídrico, Fisher Scientifics, nº de Catálogo A481-212.
 - Trihidrato de cacodilato de sodio, Sigma-Aldrich, nº de Catálogo C0250.
 - Cloruro de sodio, Fisher Scientific, nº de Catálogo S271-3.
 - Tris(hidroximetil)aminometano (Base Trizma), Sigma-Aldrich, nº de Catálogo T-4661.
 - H₂O DI (ósmosis inversa y desionización).
- 15
- Kit Crystal Screen, Hampton Research, nº de Catálogo HR2-110.
 - Kit Crystal Screen 2, Hampton Research, nº de Catálogo HR2-112.
 - JBScreen Classic 1, Jena Bioscience, nº de Catálogo CS-101L.
 - JBScreen Classic 2, Jena Bioscience, nº de Catálogo CS-102L.
 - JBScreen Classic 3, Jena Bioscience, nº de Catálogo CS-103L.
- 20
- JBScreen Classic 4, Jena Bioscience, nº de Catálogo CS-104L.
 - Rejilla de cristalización de matriz dispersa aleatoria Wizard I, Emerald BioSystems.
 - Rejilla de cristalización de matriz dispersa aleatoria Wizard II, Emerald BioSystems.

PROCEDIMIENTO

- 25 La cristalización de Proteína A recombinante se llevó a cabo con el método de cristalización por difusión de vapor de gota colgante. Los cristales de Proteína A se aumentaron de tamaño hasta el tamaño de lote de 1 ml, y se reticularon.

Preparación de la disolución.

Sulfato de amonio 3,5 M

Se disolvieron 46,2 g de sulfato de amonio en 100 ml de H₂O DI, y la disolución se filtró de forma estéril.

- 30 Cacodilato de sodio 1 M pH 6,5

Se disolvieron 21,4 g de cacodilato de sodio en 80 ml de H₂O DI. El pH se ajustó a 6,5 con una disolución concentrada de HCl. La disolución tampón se ajustó entonces a 100 ml con H₂O DI, y se filtró de forma estéril con una unidad de filtración Nalgene de 0,2 micrómetros.

Cloruro de sodio 5 M

- 35 Se disolvieron 29,2 g de cloruro de sodio en 100 ml de H₂O DI, y la disolución se filtró de forma estéril.

Formulación interna 4 de rejilla de cristalización Wizard II

Se preparó la formulación doméstica propia nº 4 del kit de identificación Wizard II mezclando 2,86 ml de sulfato de

amonio 3,5 M con 0,5 ml de cacodilato de sodio 1 M pH 6,5, 0,2 ml de cloruro de sodio 5 M y 1,44 ml de H₂O DI filtrada.

Tampón de Tris-HCl 10 mM pH 7

5 Se disolvieron 12,11 g de Base Trizma en 80 ml de H₂O DI. El pH se ajustó a 7 con disolución de HCl concentrada. El tampón se ajustó a 100 ml con H₂O DI y se filtró de forma estéril. Entonces se diluyó el tampón de Tris-HCl 1 M 100 veces en H₂O DI filtrada.

Cristalización de Proteína A en gotas colgantes.

10 La identificación de la cristalización inicial se llevó a cabo con la Proteína A recombinante de Fitzgerald International a 50,6 mg/ml en H₂O DI. Usando el método de cristalización por difusión de vapor en gota colgante de Hampton Research (véanse las Referencias), la muestra de Proteína A se examinó a temperatura ambiente en placas de 24 pocillos a una relación de proteína/reactivo 1:1 con 8 kits de identificación diferentes: JBScreen Classic 1, JBScreen Classic 2, JBScreen Classic 3, JBScreen Classic 4, Wizard I, Wizard II, Hampton Crystal Screen y Hampton Crystal Screen 2. La identificación de los cristales también se llevó a cabo con la muestra de Proteína A que se concentró hasta 120 mg/ml con una unidad de filtración centrífuga Amicon (la concentración de proteína se determinó mediante espectrofotometría a 280 nm).

Cristalización de Proteína A en lotes.

20 La cristalización de la Proteína A se montó en lotes con Proteína A recombinante de Fitzgerald International y con una de las condiciones que produjo cristales en el examen de identificación de cristalización en gota colgante inicial (es decir, la formulación n° 4 de la rejilla de cristalización de matriz Wizard II, que contenía sulfato de amonio 2 M, tampón de cacodilato 0,1 M pH 6,5, y NaCl 0,2 M). La muestra de Proteína A de Fitzgerald se concentró hasta 120 mg/ml como se describe en la sección de "cristalización de Proteína A en gotas colgantes", y se llevó a cabo la identificación del cristal en microlotes de 30 µl con el reactivo de cristalización mencionado anteriormente. Los lotes se incubaron a temperatura ambiente sin darles vueltas durante 6 a 15 días. La cristalización por lotes también se preparó con la Proteína A recombinante de Repligen Corporation en las mismas condiciones de cristalización. La cristalización de la Proteína A se aumentó entonces de escala hasta lotes de 0,5 ml usando la Proteína A recombinante de Repligen (a 53 ó 120 mg/ml) y la formulación interna n° 4 de la rejilla de cristalización Wizard II. Los lotes se incubaron durante 6 días a temperatura ambiente. Los cristales de Proteína A también se aumentaron de escala hasta lotes de 1 ml con Proteína A de Repligen a 53 mg/ml. La muestra de Proteína A se mezcló con la formulación interna n° 4 de la rejilla de cristalización Wizard II. La muestra se incubó a temperatura ambiente con volteo durante 4 semanas.

Reticulación de cristales de Proteína A.

35 Una muestra de 500 µl que contiene 15 mg/ml de cristales de Proteína A (en una suspensión al 50% en la formulación n° 4 del kit de identificación Wizard II) se reticuló con 20 µl de glutaraldehído al 25% (la concentración final de glutaraldehído fue 1%). La muestra se sometió inmediatamente a vórtice durante 5 segundos, y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos sin agitación. Tras la incubación, se añadió a la muestra 1 ml de formulación n° 4 de la rejilla de cristalización Wizard II (la concentración final de glutaraldehído fue 0,33%), y el complejo se sometió a vórtice durante 5 segundos. La muestra se incubó entonces a temperatura ambiente durante 1 h sin agitación. Tras la reticulación, la muestra de Proteína A se lavó 3 veces en 1 ml de tampón Tris-HCl 10 mM pH 7 (la centrifugación se llevó a cabo a 4.500 rpm durante 5 minutos), y los cristales reticulados (CLPCs) de Proteína A se resuspendieron en 1 ml de tampón de Tris-HCl 10 mM pH 7.

RESULTADOS

Cristales de gota colgante de Proteína A.

45 Usando el método de cristalización de gota colgante, los cristales de Proteína A de Fitzgerald International se produjeron con una muestra de proteína de 50,6 o de 120 mg/ml, y con la formulación n° 4 de la rejilla de cristalización Wizard II (Figura 1). Los cristales también se produjeron con la formulación n° 8 de la rejilla de cristalización Wizard I (sulfato de amonio 2 M en tampón de citrato pH 5,5), así como con las siguientes formulaciones de la rejilla de cristalización Wizard II: n° 31 (citrato de sodio 1 M, tampón de Tris-HCl 0,1 M pH 7, NaCl 0,2 M), n° 35 (NaH₂PO₄ 0,8 M/K₂PO₄ 1,2 M en tampón de acetato 0,1 M pH 4,5) y n° 41 (sulfato de amonio 2 M, tampón de Tris-HCl pH 7, sulfato de litio 0,2 M), datos no mostrados. En todas las condiciones, el tamaño del cristal fue alrededor de 5 micrómetros, con una forma cúbica blanda.

Cristales de Proteína A en lote.

55 Como se muestra en la Figura 2, la Proteína A recombinante de Repligen Corporation se cristalizó en lotes de 1 ml con la formulación n° 4 de la rejilla de cristalización Wizard II. La cristalización en lotes produjo cristales con forma tanto cúbica como de aguja. El tamaño de los cristales con forma cúbica fue alrededor de 10 micrómetros, mientras que el tamaño de las agujas fue más pequeño. Se obtuvieron cristales similares en lotes de 30 µl con Proteína A

tanto de Repligen Corporation como de Fitzgerald International, y en lotes de 500 µl con Proteína A de Repligen.

Cristales reticulados de Proteína A.

Los cristales de Proteína A de Repligen Corporation se reticularon con el agente de reticulación glutaraldehído. La reticulación de los cristales de Proteína A no cambió la morfología o el tamaño de los cristales (Figura 3).

5 REFERENCIAS

- Crystal Growth 101 Literature, Hanging Drop Vapor Diffusion Crystallization (2001), Hampton Research Corporation.

Ejemplo 2.

Lixiviación: Solubilidad de cristales reticulados de Proteína A controlada por pH.

10 La solubilidad de diversos cristales reticulados de Proteína A se examina siguiendo una disminución en el pH desde 7,5 hasta 2,0. Los cristales reticulados se incuban a 1 mg/ml en glicina·HCl 50 mM (pH 2,0). Se retiran alícuotas después de incubar 5 horas a 37°C con agitación. La concentración de la proteína soluble se mide a OD₂₈₀ nm tras la separación de los cristales reticulados no disueltos mediante centrifugación a 2000 rpm y la filtración del sobrenadante a través de un filtro de 0,22 µm.

15 **Ejemplo 3.**

OBJETIVO

El objetivo del experimento fue determinar la capacidad de unión de los cristales reticulados de Proteína A usando IgG humana.

EQUIPO Y MATERIALES

20 Equipos:

Centrifugadora de mesa: Eppendorf Centrifuge 5415D

Tubos Eppendorf 1 ml

Bomba de vacío

Discos de papel de filtro Whatman: 25 mm n° de Catálogo 1825025

25 Balanza: Mettler Toledo AG285

Matraz cónico

Material

Cristales reticulados de Proteína A: Obtenidos en nuestro laboratorio

IgG humana: ICN Biomedical, Inc. n° de Catálogo 64145

30 Comprimidos de disolución salina tamponada con fosfato (PBS): Sigma n° de Catálogo P-4417

Glicina: Fluka n° 50046

NaOH 0,1 N: Acros n° de Catálogo 12419-0010

PROCEDIMIENTO

Preparación del tampón

35 Disolución salina tamponada con fosfato (PBS):

Se disolvió 1 comprimido en 200 ml de agua destilada para obtener disolución salina tamponada con fosfato.

Glicina 0,2 M pH 2,0:

Se disolvieron 7,5 g de glicina en 90 ml de agua. El pH se ajustó hasta 2,0 con HCl 1 N. El volumen se completó hasta 100 ml usando agua DI. Compruébese el pH y ajústese nuevamente hasta 2,0 si es necesario.

40 Procedimiento experimental:

Los cristales reticulados (CLPCs) de Proteína A usados en este experimento estaban en Tris 10 mM pH 7,0.

Se centrifugaron 50 μ l de CLPCs para eliminar el sobrenadante. El pelete se resuspendió en PBS y se lavó con PBS 3 veces para equilibrar los CLPCs en PBS para la unión al anticuerpo.

Se añadieron 2 mg de IgG en un volumen de 100 μ l a 50 μ l de CLPCs en PBS.

5 Se mezcló suavemente y se incubó durante 30 min. a RT.

El tubo se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante (flujo a través) y se mantuvo aparte para el análisis.

El pelete se resuspendió en 100 μ l de PBS y se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min. El sobrenadante (lavado) se eliminó y se mantuvo aparte para el análisis.

10 La etapa anterior se repitió 2 veces más durante un total de 3 lavados.

Se reunieron los 3 lavados con PBS en un tubo (volumen total del lavado 300 μ l).

El pelete se resuspendió en 83 μ l de glicina 0,2 M pH 2,0. Se mezcló suavemente y se incubó durante 10 min. El tubo se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min., y el sobrenadante (eluato) se mantuvo aparte para el análisis.

15 La etapa anterior se repitió 2 veces más, y se reunieron las 3 eluciones de glicina en un tubo (volumen total de elución de 249 μ l).

Tras la 3ª elución, el pelete se resuspendió en 250 μ l de NaOH 0,1 N para eluir cualquier proteína que queda que no se eluyó con glicina 0,2 M pH 2,0.

Se incubó durante 15 min. y se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min. El sobrenadante (regeneración mediante NaOH) se conservó para el análisis.

20 La absorbancia del flujo a través, del lavado, de la elución y de la regeneración mediante NaOH se leyó a 280 nm.

El pelete de CLPCs se resuspendió entonces en 100 μ l de PBS para llevar a cabo la determinación del peso seco de la cantidad de Proteína A usada en el experimento.

Se pesó un disco de papel de filtro Whatman, y se registró el peso.

El papel de filtro se colocó sobre el matraz cónico, que se adjuntó a vacío.

25 Se añadieron 100 μ l de CLPCs en PBS sobre el papel de filtro mientras que el vacío estaba encendido, para drenar el líquido al matraz. Los CLPCs se lavaron 5 veces con agua.

El papel de filtro se dejó sobre el vacío durante cierto tiempo para dejarlo secar, y después se colocó en un horno toda la noche.

30 Al siguiente día, el papel de filtro se pesó y se calculó la cantidad de CLPCs usada en el experimento, en miligramos.

RESULTADOS

La capacidad de unión de cristales reticulados de Proteína A se calculó como la cantidad de IgG humana unida y eluida por gramo de CLPCs. La concentración de IgG en cada etapa del experimento se muestra en la Tabla 1 a continuación.

35 Tabla 1: Concentraciones de IgG en diferentes fracciones

	EXPERIMENTO 1
Carga de IgG (mg)	2,00
Flujo a través (mg)	0,410
Lavado (mg)	0,093
Elución (mg)	1,131
Regeneración de NaOH (mg)	0,162

	EXPERIMENTO 1
Total	1,796

La capacidad de unión se calculó a partir del peso seco de CLPCs e IgG humana eluida de los CLPCs, usando esta fórmula:

$$\text{Capacidad de unión en mg de IgG humana/gramo de CLPCs} = \frac{\text{IgG humana eluida} \times 1000}{\text{Peso seco de CLPCs}}$$

- 5 En la Tabla 2 a continuación se resume este dato.

Tabla 2: Cálculos de la capacidad de unión

	EXPERIMENTO 1
IgG Eluida (mg)	1,131
Peso seco de CLPCs (mg)	0,47
Capacidad de unión (mg de IgG/gramo de CLPCs)	2406,38

CONCLUSIONES

- 10 A partir de estos experimentos, se calculó que la capacidad de unión era 2406,38 mg de IgG humana por gramo de cristales reticulados de Proteína A.

Ejemplo 4

OBJETIVO

El objetivo de este experimento fue determinar la capacidad de unión de los cristales reticulados de Proteína A usando IgG humana.

- 15 EQUIPO Y MATERIALES

Equipos

Centrifugadora de mesa: Eppendorf Centrifuge 5415D

Tubos Eppendorf 1 ml

Bomba de vacío

- 20 Discos de papel de filtro Whatman: 25 mm n° de Catálogo 1825025

Balanza: Mettler Toledo AG285

Matraz cónico

Material

Cristales reticulados de Proteína A: Obtenidos en el laboratorio

- 25 IgG humana: ICN Biomedical, Inc. n° de Catálogo 64145

Comprimidos de disolución salina tamponada con fosfato (PBS): Sigma n° de Catálogo P-4417

Glicina: Fluka n° 50046

NaOH 0,1 N: Acros n° de Catálogo 12419-0010

PROCEDIMIENTO

- 30 Preparación del tampón

ES 2 530 578 T3

Disolución salina tamponada con fosfato (PBS):

Se disolvió 1 comprimido en 200 ml de agua destilada para obtener disolución salina tamponada con fosfato.

Glicina 0,2 M pH 2,0:

- 5 Se disolvieron 7,5 g de glicina en 90 ml de agua. El pH se ajustó hasta 2,0 con HCl 1 N. El volumen se completó hasta 100 ml usando agua DI. Compruébese el pH y ajústese nuevamente hasta 2,0 si es necesario.

Procedimiento experimental:

Los cristales reticulados (CLPCs) de Proteína A usados en este experimento estaban en Tris 10 mM pH 7,0.

Se centrifugaron 50 μ l de CLPCs para eliminar el sobrenadante. El pelete se resuspendió en PBS y se lavó con PBS 3 veces para equilibrar los CLPCs en PBS para la unión al anticuerpo.

- 10 Se añadieron 2 mg de IgG en un volumen de 100 μ l a 50 μ l de CLPCs en PBS.

Se mezcló suavemente y se incubó durante 30 min. a RT.

El tubo se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante (flujo a través) y se mantuvo aparte para el análisis.

- 15 El pelete se resuspendió en 100 μ l de PBS y se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min. El sobrenadante (lavado) se eliminó y se mantuvo aparte para el análisis.

La etapa anterior se repitió 2 veces más durante un total de 3 lavados.

Se reunieron los 3 lavados con PBS en un tubo (volumen total del lavado 300 μ l).

El pelete se resuspendió en 83 μ l de glicina 0,2 M pH 2,0. Se mezcló suavemente y se incubó durante 10 min.

El tubo se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min., y el sobrenadante (eluato) se mantuvo aparte para el análisis.

- 20 La etapa anterior se repitió 2 veces más, y se reunieron las 3 eluciones de glicina en un tubo (volumen total de elución de 249 μ l).

Tras la 3ª elución, el pelete se resuspendió en 250 μ l de NaOH 0,1 N para eluir cualquier proteína que queda que no se eluyó con glicina 0,2 M pH 2,0.

- 25 Se incubó durante 15 min. y se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min. El sobrenadante (regeneración mediante NaOH) se conservó para el análisis.

La absorbancia del flujo a través, del lavado, de la elución y de la regeneración mediante NaOH se leyó a 280 nm.

El pelete de CLPCs se resuspendió entonces en 100 μ l de PBS para llevar a cabo la determinación del peso seco de la cantidad de Proteína A usada en el experimento.

Se pesó un disco de papel de filtro Whatman, y se registró el peso.

- 30 El papel de filtro se colocó sobre el matraz cónico, que se adjuntó a vacío.

Se añadieron 100 μ l de CLPCs en PBS sobre el papel de filtro mientras que el vacío estaba encendido, para drenar el líquido al matraz. Los CLPCs se lavaron 5 veces con agua.

El papel de filtro se dejó sobre el vacío durante cierto tiempo para dejarlo secar, y después se colocó en un horno toda la noche.

- 35 Al siguiente día, el papel de filtro se pesó y se calculó la cantidad de CLPCs usada en el experimento, en miligramos.

RESULTADOS

- 40 La capacidad de unión de cristales reticulados de Proteína A se calculó como la cantidad de IgG humana unida y eluida por gramo de CLPCs. La concentración de IgG en cada etapa del experimento se muestra en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Concentraciones de IgG en diferentes fracciones

	EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2	EXPERIMENTO 3
Carga de IgG (mg)	2,00	10,00	10,00
Flujo a través (mg)	1,34	8,80	9,23
Lavado (mg)	0,24	0,64	0,42
Elución (mg)	0,32	0,62	0,18
Regeneración de NaOH (mg)			0,03
Total	1,90	10,06	9,83

La capacidad de unión se calculó a partir del peso seco de CLPCs e IgG humana eluida de los CLPCs, usando esta fórmula:

$$5 \quad \text{Capacidad de unión en mg de IgG humana/gramo de CLPCs} = \frac{\text{IgG humana eluida} \times 1000}{\text{Peso seco de CLPCs}}$$

En la Tabla 4 a continuación se resume este dato.

Tabla 4: Cálculos de la capacidad de unión

	EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2	EXPERIMENTO 3
IgG Eluida (mg)	0,32	0,62	0,08
Peso seco de CLPCs (mg)	1,55	2,75	0,79
Capacidad de unión (mg de IgG/gramo de CLPCs)	206,45	225,4	227,8
Capacidad de unión promedio (mg de IgG/gramo de CLPCs)	219,86		

CONCLUSIONES

- 10 A partir de estos experimentos, se calculó que la capacidad de unión promedio es 219,86 mg de IgG humana por gramo de cristales reticulados de Proteína A.

Ejemplo 5

OBJETIVO

- 15 El objetivo de este experimento fue determinar la capacidad de unión de los cristales reticulados de Proteína A usando IgG humana.

EQUIPO Y MATERIALES

Equipos

Centrifugadora de mesa: Eppendorf Centrifuge 5415D

Tubos Eppendorf 1 ml

- 20 Bomba de vacío

Discos de papel de filtro Whatman: 25 mm n° de Catálogo 1825025

Balanza: Mettler Toledo AG285

Matraz cónico

Material

Cristales reticulados de Proteína A: Obtenidos en el laboratorio

IgG humana: ICN Biomedical, Inc. n° de Catálogo 64145

Comprimidos de disolución salina tamponada con fosfato (PBS): Sigma n° de Catálogo P-4417

5 Glicina: Fluka n° 50046

NaOH 0,1 N: Acros n° de Catálogo 12419-0010

PROCEDIMIENTO

Preparación del tampón

Disolución salina tamponada con fosfato (PBS):

10 Se disolvió 1 comprimido en 200 ml de agua destilada para obtener disolución salina tamponada con fosfato.

Glicina 0,2 M pH 2,0:

Se disolvieron 7,5 g de glicina en 90 ml de agua. El pH se ajustó hasta 2,0 con HCl 1 N. El volumen se completó hasta 100 ml usando agua DI. Compruébese el pH y ajústese nuevamente hasta 2,0 si es necesario.

Procedimiento experimental:

15 Los cristales reticulados (CLPCs) de Proteína A usados en este experimento estaban en Tris 10 mM pH 7,0.

Se centrifugaron 50 μ l de CLPCs para eliminar el sobrenadante. El pelete se resuspendió en PBS y se lavó con PBS 3 veces para equilibrar los CLPCs en PBS para la unión al anticuerpo.

Se añadieron 2 mg de IgG en un volumen de 100 μ l a 50 μ l de CLPCs en PBS.

Se mezcló suavemente y se incubó durante 30 min. a RT.

20 El tubo se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante (flujo a través) y se mantuvo aparte para el análisis.

El pelete se resuspendió en 100 μ l de PBS y se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min. El sobrenadante (lavado) se eliminó y se mantuvo aparte para el análisis.

La etapa anterior se repitió 2 veces más durante un total de 3 lavados.

25 Se reunieron los 3 lavados con PBS en un tubo (volumen total del lavado 300 μ l).

El pelete se resuspendió en 83 μ l de glicina 0,2 M pH 2,0. Se mezcló suavemente y se incubó durante 10 min.

El tubo se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min., y el sobrenadante (eluato) se mantuvo aparte para el análisis.

La etapa anterior se repitió 2 veces más, y se reunieron las 3 eluciones de glicina en un tubo (volumen total de elución de 249 μ l).

30 Tras la 3ª elución, el pelete se resuspendió en 250 μ l de NaOH 0,1 N para eluir cualquier proteína que queda que no se eluyó con glicina 0,2 M pH 2,0.

Se incubó durante 15 min. y se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min. El sobrenadante (regeneración mediante NaOH) se conservó para el análisis.

La absorbancia del flujo a través, del lavado, de la elución y de la regeneración mediante NaOH se leyó a 280 nm.

35 El pelete de CLPCs se resuspendió entonces en 100 μ l de PBS para llevar a cabo la determinación del peso seco de la cantidad de Proteína A usada en el experimento.

Se pesó un disco de papel de filtro Whatman, y se registró el peso.

El papel de filtro se colocó sobre el matraz cónico, que se adjuntó a vacío.

40 Se añadieron 100 μ l de CLPCs en PBS sobre el papel de filtro mientras que el vacío estaba encendido, para drenar el líquido al matraz. Los CLPCs se lavaron 5 veces con agua.

El papel de filtro se dejó sobre el vacío durante cierto tiempo para dejarlo secar, y después se colocó en un horno toda la noche.

Al siguiente día, el papel de filtro se pesó y se calculó la cantidad de CLPCs usada en el experimento, en miligramos.

5 RESULTADOS

La capacidad de unión de cristales reticulados de Proteína A se calculó como la cantidad de IgG humana unida y eluida por gramo de CLPCs. La concentración de IgG en cada etapa del experimento se muestra en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5: Concentraciones de IgG en diferentes fracciones

	EXPERIMENTO 1
Carga de IgG (mg)	2,00
Flujo a través (mg)	1,066
Lavado (mg)	0,179
Elución (mg)	0,592
Regeneración de NaOH (mg)	0,109
Total	1,946

10

La capacidad de unión se calculó a partir del peso seco de CLPCs e IgG humana eluida de los CLPCs, usando esta fórmula:

$$\text{Capacidad de unión en mg de IgG humana/gramo de CLPCs} = \frac{\text{IgG humana eluida} \times 1000}{\text{Peso seco de CLPCs}}$$

En la Tabla 6 a continuación se resume este dato.

15

Tabla 6: Cálculos de la capacidad de unión

	EXPERIMENTO 1
IgG Eluida (mg)	0,592
Peso seco de CLPCs (mg)	0,55
Capacidad de unión (mg de IgG/gramo de CLPCs)	1076,4

CONCLUSIONES

A partir de estos experimentos, se calculó que la capacidad de unión era 1076,4 mg de IgG humana por gramo de cristales reticulados de Proteína A.

20 **Ejemplo 6**

Este Ejemplo describe la determinación de la capacidad de unión a inmunoglobulina humana G (IgG) de los CLPCs de Proteína A tanto en lotes como en columnas.

EQUIPO Y MATERIALES

Centrifuga 5415C: Eppendorf International, Inc.

25 Unidades de filtración centrífuga Ultrafree®-MC: Durapore® PVDF 0,2 μm, Millipore

Filtro de microfibras de vidrio: Whatman, Schleicher & Schuell, nº de Catálogo 1825-025

Columna de vacío Sep-Pak® vacía: Waters Corporation

Medidor de la conductividad del pH: Denver Instrument, Modelo 220

Espectrofotómetro UV-Visible 8453: Agilent Technologies

Cristales reticulados de Proteína A: producidos usando tecnología patentada de Altus

H₂O DI (ósmosis inversa y desionización)

5 Disolución de ácido clorhídrico, 1 N certificado: Fisher Scientific, nº de Catálogo SA48-1

Disolución de hidróxido sódico N/2, 0,5 N: Fisher Scientific, nº de Catálogo SS270-1

Disolución de hidróxido sódico, 1 N certificada: Fisher Scientifics, nº de Catálogo SS266-1

Comprimidos de disolución salina tamponada con fosfato: Sigma-Aldrich, nº de Catálogo P-4417

Ácido cítrico anhidro: Fisher Scientific, nº de Catálogo A940-1

10 Glicina: Fisher Scientific, nº de Catálogo G48-500

Tris(hidroximetil)aminometano (Base Trizma): Sigma-Aldrich, nº de Catálogo T-4661

PROCEDIMIENTO

Preparación de disoluciones

Disolución salina tamponada con fosfato

15 Se disolvió un comprimido de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) de Sigma-Aldrich en 200 ml de H₂O DI, para preparar la siguiente disolución de PBS: tampón de fosfato 0,01 M, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM a pH 7,4.

Tampón de Tris-HCl 1M pH 8,5

Se disolvieron 12,11 g de Base Trizma en 80 ml de H₂O DI. El pH se ajustó a 8,5 con disolución de HCl 1 N, y la disolución se ajustó a 100 ml con H₂O DI.

20 Tampón de glicina 0,2 M pH 2

Se disolvieron 1,5 g de glicina en 80 ml de H₂O DI. El pH se ajustó a 2 con disolución de HCl 1 N, y la disolución se ajustó a 100 ml con H₂O DI.

Tampón de ácido cítrico 0,1 M pH 3

25 Se disolvieron 1,9 g de ácido cítrico anhidro en 80 ml de H₂O DI. El pH se ajustó a 3 con disolución de NaOH 1 N, y la disolución se ajustó a 100 ml con H₂O DI.

Disolución de NaOH 0,1 N

Se diluyeron 100 ml de disolución de NaOH 0,5 N con 400 ml de H₂O DI.

Capacidad de unión a IgG humana de los CLPCs de Proteína A

Determinación de la capacidad de unión a IgG en columnas

30 Una columna de vacío Sep-Pak® vacía se empaquetó con CLPCs de Proteína A (el volumen del lecho fue aproximadamente 500 µl con un CLPC de Proteína A).

La columna se equilibró con 5 ml de PBS, y se cargó con 2000 mg de IgG humana de ICN Biomedicals a una concentración de 20 mg/ml en PBS.

35 El flujo a través se recogió en alícuotas de 10 ml, y la concentración de proteína se determinó mediante espectrofotometría a 280 nm.

La columna se lavó entonces con 5 ml de PBS, y se recogieron fracciones de 1 ml.

Se eluyó IgG humana con 5 ml de tampón de glicina 0,2 M pH 2, y el eluato de glicina se recogió en alícuotas de 1 ml y se estudió en busca de la concentración de proteína mediante espectrofotometría a 280 nm. Cada fracción eluida se ajustó a pH fisiológico con 100 µl de tampón de Tris-HCl 1 M pH 8,5.

40 Tras la elución de glicina, la columna se regeneró con 5 ml de tampón de ácido cítrico 0,1 M/NaOH pH 3, que se recogió tras su elución desde la columna.

Finalmente, la columna se limpió con 3 ml de disolución 0,1 M de NaOH. Se recogieron fracciones de 1 ml, y la columna se lavó con 5 ml de PBS.

Tras los ensayos espectrofotométricos a A280, las fracciones de flujo a través, así como las fracciones de los lavados de PBS y de los lavados de NaOH se reunieron por separado.

5 RESULTADOS

La capacidad de unión de los cristales reticulados de Proteína A se calculó como la cantidad de IgG humana unida y eluida por gramo de CLPCs. La concentración de IgG en cada etapa del experimento se muestra en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7: Concentraciones de IgG en diferentes fracciones

	EXPERIMENTO 1
Carga de IgG (mg)	2000
Flujo a través (mg)	1445,51
Lavado (mg)	439,3
Elución (mg)	75,1
Regeneración de NaOH (mg)	0,0
Total	1959,91

10

La capacidad de unión se calculó a partir del peso seco de CLPCs e IgG humana eluida de los CLPCs, usando esta fórmula:

$$\text{Capacidad de unión en mg de IgG humana/gramo de CLPCs} = \frac{\text{IgG humana eluida} \times 1000}{\text{Peso seco de CLPCs}}$$

En la Tabla 8 a continuación se resume este dato.

15

Tabla 8: Cálculos de la capacidad de unión

	EXPERIMENTO 1
IgG Eluida (mg)	75,1
Peso seco de CLPCs (mg)	389,4
Capacidad de unión (mg de IgG/gramo de CLPCs)	192,86

CONCLUSIONES

A partir de estos experimentos, se calculó que la capacidad de unión era 192,86 mg de IgG humana por gramo de cristales reticulados de Proteína A, o 150,2 mg/ml de columna de Proteína A.

20 Se ha descrito un número de realizaciones de la invención. No obstante, se entenderá que se pueden hacer diversas modificaciones sin separarse del espíritu y alcance de la invención. En consecuencia, otras realizaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Experimento nº 7

25 En este experimento, se evaluaron los efectos del post-tratamiento sobre la capacidad de unión del CLPC de Proteína A. Las membranas impregnadas con CLPC de Proteína A se obtienen formando una disolución de moldeo de la membrana con poliuretano en un tipo específico de disolvente; añadiendo CLPC de Proteína A a la disolución de moldeo; precipitando en un medio adecuado un material compuesto de membrana impregnada; y procesando opcionalmente el material compuesto al secar antes del uso. Las condiciones específicas del procesamiento, tales como el tipo de disolvente de moldeo de la membrana, por ejemplo DMF, la cantidad de CLPC de Proteína A, el medio del baño de precipitación (IPA/agua 50/50) y las condiciones del post-tratamiento (húmedo, nunca seco), para
30 cada una de las membranas de ensayo impregnadas se identifican y se ensayan. La capacidad de unión de CLPC

de Proteína A se ensaya para cada una de las membranas de ensayo impregnadas.

Experimento nº 8

5 En este experimento, se obtienen dos grupos de membranas de ensayo impregnadas, a saber, Grupos A y B. Las membranas del Grupo A (por ejemplo, A1-A2) se obtienen a partir de poliuretano en un disolvente de NMP. Las membranas del Grupo B (por ejemplo, B1-B2) se obtienen a partir de poliuretano en un disolvente de DMF. Las membranas impregnadas tienen un diámetro de alrededor de 2,54 cm. Se identifican y se ensayan las condiciones específicas del procesamiento, tales como el tipo de disolvente de moldeo de la membrana, por ejemplo DMF o NMP, la cantidad de CLPC de Proteína A, los medios del baño de precipitación (IPA/agua 50/50, o agua sola) y las condiciones de post-tratamiento (húmedo, nunca seco; o glicerol al 40% seco), la exposición a radiación gamma (15 a 40 kGy) para cada una de las membranas de ensayo impregnadas. Una vez formada, una membrana de cada grupo se expone a radiación gamma a ciertas dosis. La otra membrana en cada grupo se usa como un control sin exposición a radiación gamma. La capacidad de unión al anticuerpo de cada una de las membranas se ensaya entonces con una disolución de ensayo de anticuerpo. Los resultados proporcionarán la retención de la capacidad de unión y la estabilidad a disolventes orgánicos y a exposición a radiación gamma de CLPC de Proteína A.

15 Secuencias:

La secuencia de ADNc de Proteína a procedente de *Staphylococcus aureus* se muestra a continuación (Número de Acceso GenBank: X61307) (SEC ID NO:1).

```

1 atgatgactt tacaatata tacagggggt attaattga aaaagaaaa catttattca
61 161 attcgtaac taggtgagg tattgcatct gtaacttag gtacattact tataatctggt
121 221 ggcgtaaac ctgctgcaaa tgctgcgcaa cacgatgaag ctcaacaaaa tgcttttat

181 281 caagtgttaa atatgcctaa cttaaagcgt gatcaacgta atggttttat ccaaagcctt
241 341 aaagatgac caagccaaag tgctaacggt ttaggtgaag ctcaaaaact taatgactct
301 441 caagctcaa aagctgatgc gcaacaaaat aagttcaaca aagatcaaca aagcgccttc
361 541 tatgaaatct tgaacatgcc taacttaaac gaagagcaac gcaatggttt cattcaaaagt
421 641 cttaaagacg atccaagcca aagcactaac gttttagggt aagctaaaaa attaaacgaa
481 741 tctcaagcac cgaagctga caacaatttc aacaagaac acaaaatgc ttctatgaa
541 841 atcttgaaca tgccactact gaacgaagaa caacgcaatg gtttcatcca aagcttaaaa
601 941 gatgacccaa gtcaaagtgc taaccttta gcagaagcta aaaagctaaa tgatgcacaa
661 1041 gcaccaaaa ctgacaacaa attcaacaaa gaacaacaaa atgctttcta tgaatttta
721 1141 catttaccta acttaactga agaacaacgt aacggcttca tccaagcct taaagacgat
781 1241 ccttcagtga gcaaagaaat ttagcagaa gctaaaaagc taacgatgc tcaagcacca
841 1341 aaagaggaag acaacaacaa gcctggcaaa gaagacaaca acaagcctgg taaagaagac
901 1441 ggcaacaac ctggtaaaga agacaacaaa aaacctggca aagaagacgg caacaaacct
961 1541 ggtaaagaag acaacaaaaa acctggtaaa gaagatggca acaaacctgg taaagaagac
1021 1641 ggcaacaagc ctggtaaaga agatggcaac aagcctggta aagaagacgg caacggagta
1081 1741 catgtcgtta aacctggtga tacagtaaat gacattgcaa aagcaaacgg cactactgct
1141 1841 gacaaaattg ctgtagataa caaattagct gataaaaaca tgatcaaacc tgggtcaagaa
1201 1941 cttgtgttg ataagaagca accagcaaac catgcagatg ctaacaaagc tcaagcatta
1261 2041 ccagaaactg gtgaagaaaa tccattcatc ggtacaactg tatttgggtg attatcatta
1321 2141 gcgttaggtg cagcgttatt agctggacgt cgtcgcgaac tataa

```

20 La Proteína A traducida de la secuencia de *Staphylococcus aureus* se muestra a continuación (Número de Acceso GenBank: CAA43604) (SEC ID NO:2).

1 mmtlqihgg inlkkniys irklvgias vltgtllisg gvtpaanaaq hdeaqnafy
61 qvlnmpnl na dqrngfiqsl kddpsqsanv lgeaqklnds qapkadaqqn kfnkdqqsaf
121 yeilnmpnl eeqrngfiqs lkddpsqstn vlgeakkline sqapkadnnf nkeqqnafye
181 ilnmpnlnee qrngfiqslk ddpsqsanll aeakklnaq apkadnkfnk eqqnafyeil
241 hlpnlteeqr ngfiqslkdd psvskeilae akklndaqap keednnkpgk ednnkpgked
301 gnkpgkednk kpgkedgnkpk gkednkpgk edgnkpgked gnkpgkedgn kpgkedgngv
361 hvvkpgdtvn diakangtta dkiavdnkla dknmikpgqe lvvdkkqpan hadankaqal
421 petgeenpfi gttvfgglsl algaallagr rrel

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende forma cristalina reticulada de Proteína A.
2. Un método para purificar una inmunoglobulina, que comprende poner en contacto una disolución que comprende dicha inmunoglobulina con la composición de la reivindicación 1, de manera que dicha inmunoglobulina se adsorbe sobre la Proteína A cristalina.
3. El método de la reivindicación 2, en el que dicha inmunoglobulina es un anticuerpo que es al menos uno de un anticuerpo terapéutico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fab, y un fragmento Fc.
4. El método de la reivindicación 2, en el que dicha inmunoglobulina es al menos una de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo completamente humano, y un anticuerpo humanizado.
5. El método de la reivindicación 2, en el que dicha inmunoglobulina pertenece a la clase IgG.
6. La composición de la reivindicación 1, en la que la forma cristalina reticulada de Proteína A está reticulada con glutaraldehído.
7. Un kit que comprende la composición de la reivindicación 1, e instrucciones escritas que describen su uso.
8. La composición de la reivindicación 1, en la que la forma cristalina reticulada de la Proteína A presenta una capacidad de unión mayor por una inmunoglobulina en comparación con una composición que comprende una cantidad correspondiente de una forma inmovilizada de Proteína A que no es una forma cristalina reticulada.
9. La composición de la reivindicación 1, en la que la concentración de agente de reticulación es suficiente para dar como resultado alrededor de 0,0% de lixiviación de la Proteína A cuando se compara con una composición que comprende una cantidad correspondiente de una Proteína A inmovilizada que no es una forma cristalina reticulada con al menos la misma concentración de agente de reticulación.
10. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición se usa en al menos uno de una columna preempaquetada, una membrana, y un dispositivo extracorpóreo.
11. Un procedimiento para la purificación de inmunoglobulinas, que comprende:
 - (a) mezclar un medio que contiene inmunoglobulinas con una disolución tampón que comprende una combinación de cationes y aniones a un pH en el intervalo de alrededor de pH 7,0 a pH 10, dando como resultado un medio inmunoglobulínico tamponado;
 - (b) poner en contacto dicho medio inmunoglobulínico tamponado con un adsorbente que comprende una composición de la reivindicación 1, de manera que el adsorbente adsorbe suficientemente las inmunoglobulinas presentes en dicho medio inmunoglobulínico tamponado;
 - (c) lavar el adsorbente que tiene inmunoglobulinas adsorbidas en él con dicha disolución tampón;
 - (d) poner en contacto dicho adsorbente que tiene inmunoglobulinas adsorbidas en él con una disolución tampón que tiene un pH en el intervalo de alrededor de pH 2 a pH 6, para eliminar las inmunoglobulinas adsorbidas del adsorbente; y
 - (e) recuperar en forma sustancialmente pura las inmunoglobulinas eliminadas.
12. Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que la puesta en contacto de dicho medio inmunoglobulínico tamponado con dicho adsorbente se logra en una columna que comprende dicho adsorbente.
13. Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicho medio que contiene inmunoglobulinas se obtiene de al menos uno de un hibridoma, suero de mamífero normal, suero de mamífero inunitario, plasma de mamífero, fluido ascítico de mamífero, fluido de cultivo tisular, fluido de cultivo de células de mamífero, fluido de cultivo de células bacterianas, fluido de cultivo de levaduras, fluido de fuente transgénica, y extracto vegetal que contiene inmunoglobulinas.
14. Un método para obtener forma cristalina de Proteína A usando el método de cristalización por difusión de vapor en gota colgante o el método de cristalización por lotes, que comprende las etapas de:
 - (a) colocar Proteína A en agua desionizada a una relación de proteína reactivo 1:1, en el que dicho reactivo se selecciona del grupo que consiste en una composición que contiene sulfato de amonio 2 M, tampón de cacodilato 0,1 M pH 6,5 y NaCl 0,2 M; sulfato de amonio 2 M en tampón de citrato pH 5,5; citrato de sodio 1 M, tampón de Tris-HCl 0,1 M pH 7, y NaCl 0,2 M; NaH₂PO₄ 0,8 M/K₂PO₄ 1,2 M en tampón de acetato 0,1 M pH 4,5; y sulfato de amonio 2 M, tampón de Tris-HCl pH 7, y sulfato de litio 0,2 M; y

(b) incubar hasta que se produce la formación de cristal.

15. Un método según la reivindicación 14, en el que la Proteína A en la etapa (a) está a una concentración de alrededor de 50,6 mg/ml o alrededor de 120 mg/ml de Proteína A en agua desionizada.

5 16. Un método para obtener forma cristalina reticulada de Proteína A, que comprende mezclar forma cristalina de Proteína A con glutaraldehído, en el que el glutaraldehído está opcionalmente a una concentración final de alrededor de 1%.

17. Un método de purificación de una inmunoglobulina a partir de una composición que comprende dicha inmunoglobulina, comprendiendo dicho método poner en contacto la composición que comprende la inmunoglobulina a purificar con la composición de la reivindicación 1.

10

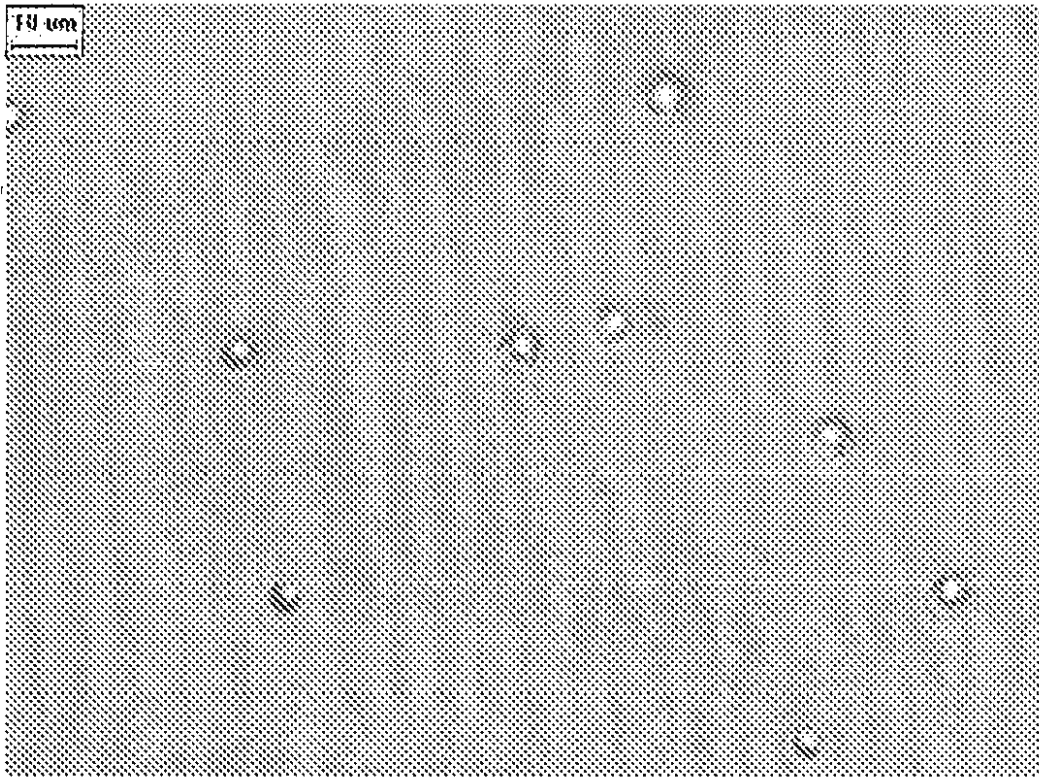


FIGURA 1

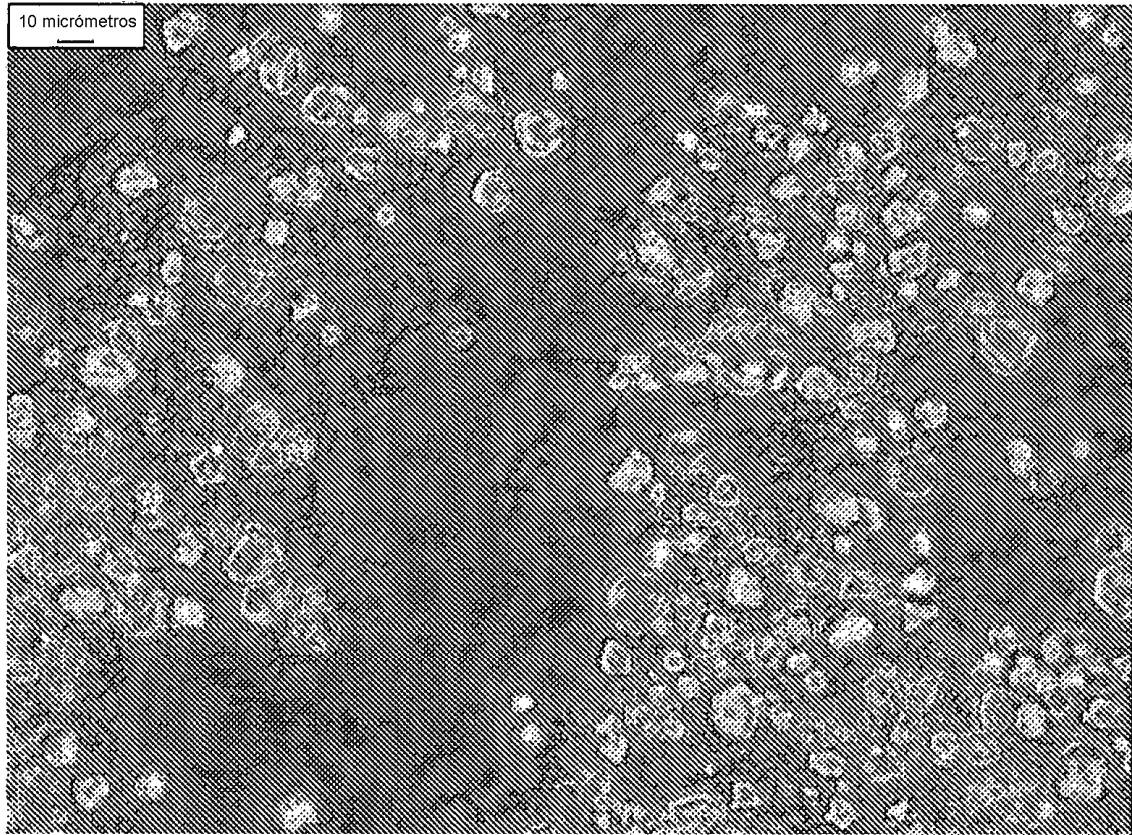


FIGURA 2

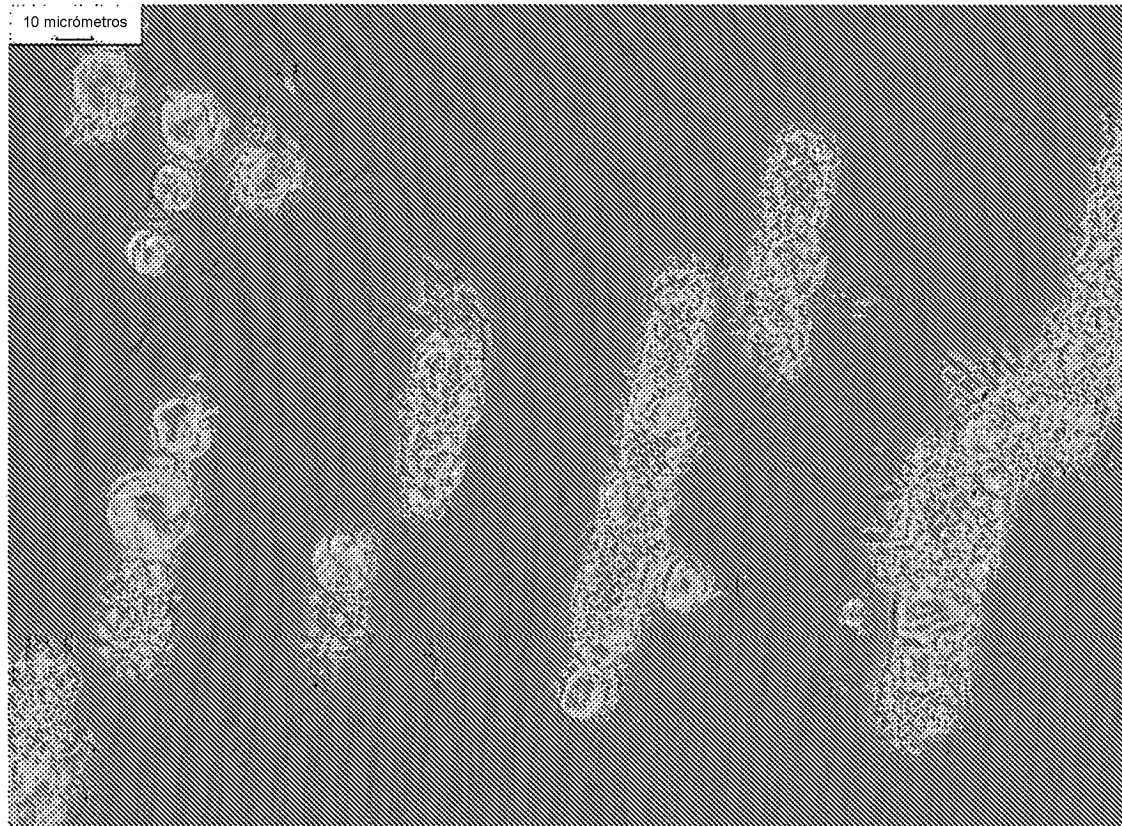


FIGURA 3