

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 079**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2006 E 06784989 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 1896504**

54 Título: **Métodos para purificar anticuerpos de la región Fc**

30 Prioridad:

17.06.2005 US 691821 P

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

30.05.2013

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:

**GODAVARTI, RANGANATHAN y
ISKRA, TIMOTHY**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 405 079 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

Métodos para purificar anticuerpos de la región Fc.

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reclama prioridad ante la solicitud de patente provisional "MÉTODOS DE PURIFICAR LA REGIÓN Fc CON CONTENIDO DE PROTEÍNAS", presentada el 17 de junio de 2005, con número de serie 60/691821.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Los anticuerpos son poderosos componentes del sistema inmune de muchos animales y especialmente de los humanos. Avances recientes en tecnología recombinante han posibilitado la producción de anticuerpos contra virtualmente cualquier objetivo, por ejemplo, células cancerígenas, bacterias y virus. Por lo general, un anticuerpo se produce utilizando una línea celular que ha sido diseñada para expresar el anticuerpo a altos niveles. La línea celular diseñada crece en un cultivo que consta de una mezcla compleja de azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento, además de diversas proteínas, incluyendo, por ejemplo, proteínas séricas. No obstante, la separación de anticuerpos completos de derivados celulares y componentes de cultivo hasta una pureza suficiente para su uso en investigación o como terapéutica supone un formidable reto. La purificación de las moléculas de anticuerpo resulta de vital importancia si los anticuerpos se van a utilizar como medicamento para su administración a humanos.

15

20

25

30

[0003] Los esquemas (o trenes) tradicionales de purificación de anticuerpos suelen constar de una etapa de cromatografía que explota una capacidad de la molécula de anticuerpo de ligar o ser retenido por la fase sólida (o fase sólida funcional) de una columna de cromatografía comparada con la vinculación o retención de varias impurezas. Algunos esquemas se han propuesto o se han llevado a cabo para purificar anticuerpos que primero enlazan regiones CH2/CH3 que contienen proteínas con la Proteína A inmovilizada en una fase sólida, seguido de la eliminación de impurezas enlazadas con la fase sólida al lavar la fase sólida con un disolvente electrolito hidrofóbico y la posterior recuperación de las regiones CH2/CH3 que contienen proteínas de la fase sólida. No obstante, estos esquemas quedan limitados porque las condiciones utilizadas para enlazar las regiones CH2/CH3 que contienen proteínas también enlazan impurezas (p.ej., anticuerpos con regiones CH2/CH3 incompletas). En el desarrollo de la terapéutica humana, esas impurezas son muy indeseables.

35

[0004] En consecuencia, existe una necesidad de mejoras en la purificación de proteínas o polipéptidos con regiones constantes, en particular, proteínas con regiones Fc (p.ej., anticuerpos), producidos mediante cultivo celular.

40

[0005] US 2004/229330 revela un método para la captura y purificación altamente eficaz de proteínas etiquetadas desde una preparación proteica, especialmente una proteína etiquetada de baja cantidad.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0006] En varios aspectos, la presente invención ofrece métodos para separar anticuerpos con una región Fc de un líquido fuente que consiste en el anticuerpo y en una o más impurezas. En los métodos de la invención, el anticuerpo con una región Fc (la proteína objetivo) es absorbida a un agente aglutinador Fc que consta de una o más proteína A y Proteína G, y luego el agente aglutinador Fc se lava con una solución búfer con de 0,5M a 3M CaCl₂ para eliminar una o más impurezas. La proteína queda cubierta desde el agente aglutinador Fc en una solución de elución con pH de 2 a 4. Los métodos de la invención son particularmente útiles para eliminar impurezas como especies variables leídas por intrón (IRT), especies ligadas bajo disulfuro (UDB) y/o especies variables de bajo peso molecular (LMW). Los métodos de la invención también resultan efectivos en la eliminación de impurezas como las proteínas de célula huésped (HCP) y ADN.

45

50

[0007] Los métodos de la presente invención incluyen una o más etapas de separación cromatográfica y puede incluir, además, una o más etapas de filtración. Las etapas de separación cromatográfica pueden ser continuas o discontinuas (p.ej., un procesamiento por lotes), o una combinación de ambas. En varias realizaciones, los métodos incluyen una o más etapas de filtración, por ejemplo, para eliminar virus, concentrar y estabilizar la solución que contiene la proteína objetivo, y para eliminar contaminantes microbianos.

55

60

[0008] En varias realizaciones, la región Fc con anticuerpos es una fusión de anticuerpos, un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, o un anticuerpo humanizado. En una realización preferente, la región Fc con contenido de anticuerpos es un anticuerpo humano o humanizado anti-IL-13. Otra posibilidad, en otras realizaciones, es que la región Fc con anticuerpos puede ligar un antígeno como Ap, CD3, CD52, VEGF, EGFR, CD33, CD20, HER-2, TNFa, CD25, RSV, IgE, gp IIb/IIIa, o integrina CD11a o α4.

- [0009] En varias realizaciones, la región Fc con contenido de anticuerpos se produce por recombinación. En varias realizaciones, la región Fc con contenido de anticuerpos se produce por recombinación en una célula de ovario de hámster chino (CHO).
- 5 [0010] En varias realizaciones, uno o más impurezas incluyen una o más proteína de célula huésped, ADN de célula huésped, una proteína de cultivo celular, especies no deseadas del anticuerpo con una región Fc y mezcla entre ellos. Por ejemplo, en varias realizaciones, las especies de anticuerpos no deseadas con una región Fc incluyen uno o más fragmentos o cadenas de anticuerpos con secuencia leída por intrón, uno o más fragmentos o cadenas de anticuerpos con una inadecuada pérdida de disulfida, de un semi-anticuerpo o fragmento, dímero de cadena ligera o fragmento, dímero de cadena pesada o fragmento.
- 10 [0011] En cierto modo, los métodos de la presente invención purifican un anticuerpo con una región Fc desde un líquido fuente que consta del anticuerpo y una o más impurezas mediante la absorción del anticuerpo a un agente aglutinador Fc que incluye una o más Proteína A y Proteína G seguido de un lavado del agente aglutinador Fc con una solución búfer que contiene de 0,5M a 3M CaCl_2 para eliminar una o más impurezas, y después cubrir la proteína del agente aglutinador Fc en un búfer de elución con pH entre 2-4. En varias realizaciones, las etapas de absorción del anticuerpo a un agente aglutinador Fc y lavado del agente aglutinador Fc con una solución búfer con CaCl_2 se realizan con una temperatura entre 2°C hasta unos 24°C. La etapa de recuperación del anticuerpo del agente aglutinador Fc incluye eluir la proteína utilizando un búfer de elución con el pH entre 2,0 a 4.
- 15 [0012] El agente aglutinador de la región Fc incluye una o más Proteína A y Proteína G. En una realización preferida, el agente aglutinador Fc se inmovilia en una fase sólida. La fase sólida puede incluir, por ejemplo, una o más gotículas de sílice, una matriz de agarosa, y mezclas de ellas.
- 20 [0013] En diversas realizaciones, la solución búfer con CaCl_2 tiene un valor de pH en el intervalo entre aproximadamente 4 a aproximadamente 9, y en algunas realizaciones, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8, entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 7,5 o entre aproximadamente 6 a aproximadamente 8. Los valores y rangos incluidos y / o intermedios dentro de los rangos establecidos en este documento también se pretende que sea dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, el CaCl_2 tiene un valor de pH entre aproximadamente 7,1 a aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,9, entre aproximadamente 7,3 a aproximadamente 7,7, entre aproximadamente 7,4 a aproximadamente 7,6, entre aproximadamente 4 a aproximadamente 5, de entre 5 a aproximadamente 6, de entre aproximadamente 6 a aproximadamente 7, o entre aproximadamente 8 a aproximadamente 9.
- 25 [0014] Además, oscila tener valores citados en esta memoria como un límite superior o inferior se pretende que estén dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, el CaCl_2 tiene un pH de al menos aproximadamente (o sobre) 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, u 8.
- 30 [0015] La solución buffer tiene una concentración de CaCl_2 en el intervalo entre aproximadamente 0,5 M hasta 3M, entre aproximadamente 1,0 M a aproximadamente 3 M o entre aproximadamente 0,6 M a aproximadamente 2,5 M. Por ejemplo, el buffer puede comprender al menos 0,6 M CaCl_2 o al menos 2 M de CaCl_2 . Los valores y rangos incluidos y / o intermedios dentro de los rangos establecidos en la presente invención. Por ejemplo, la solución buffer tiene una concentración de CaCl_2 entre aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 0,75 M, entre aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 0,8 M, entre aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 0,9M, entre aproximadamente 0,5 M a 1,0 M, entre aproximadamente 0,5 M a 2 M, entre aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 2,0 M, entre aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 2,5 M, entre aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 3,0 M, o entre aproximadamente 2,5 M a aproximadamente 3 M.
- 35 [0016] Además, se pretende que los rangos con valores aquí mencionados como límite superior o inferior se encuentren dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, la solución búfer posee concentración de CaCl_2 de al menos (o aproximadamente) 0,6M, 1M, 1,5M, 2M, 2,5M o 3M. En varias realizaciones, la solución búfer contiene CaCl_2 tiene una temperatura entre unos 2°C y 24°C.
- 40 [0017] La etapa de recuperación del anticuerpo del agente aglutinador Fc incluye eluir la proteína utilizando un búfer de elución con un pH en el rango entre 2,0 y 4,0, más preferiblemente entre 2,5 y 3,5. Se pretende que los valores y rangos incluidos y/o intermedios dentro de los rangos establecidos aquí se encuentren dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, el búfer de elución tiene un pH de entre aproximadamente 2 y 3, o entre 3 y 4.
- 45 [0018] Además, se pretende que los rangos con valores aquí mencionados como límite superior e inferior se encuentren dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, el búfer de elución tiene un pH de al menos (o aproximadamente) 2, 2,5, 3, 3,5 o 4.
- 50 [0019] En varias realizaciones, los anticuerpos recuperados pueden ser sometidos a etapas de purificación adicionales bien antes o después de la etapa de la cromatografía del agente aglutinador Fc. Por ejemplo, otras etapas de purificación ejemplares incluyen, sin limitarse: cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de afinidad en metales inmovilizados, cromatografía de interacción hidrofóbica
- 55 [0019] En varias realizaciones, los anticuerpos recuperados pueden ser sometidos a etapas de purificación adicionales bien antes o después de la etapa de la cromatografía del agente aglutinador Fc. Por ejemplo, otras etapas de purificación ejemplares incluyen, sin limitarse: cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de afinidad en metales inmovilizados, cromatografía de interacción hidrofóbica
- 60 [0019] En varias realizaciones, los anticuerpos recuperados pueden ser sometidos a etapas de purificación adicionales bien antes o después de la etapa de la cromatografía del agente aglutinador Fc. Por ejemplo, otras etapas de purificación ejemplares incluyen, sin limitarse: cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de afinidad en metales inmovilizados, cromatografía de interacción hidrofóbica
- 65 [0019] En varias realizaciones, los anticuerpos recuperados pueden ser sometidos a etapas de purificación adicionales bien antes o después de la etapa de la cromatografía del agente aglutinador Fc. Por ejemplo, otras etapas de purificación ejemplares incluyen, sin limitarse: cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de afinidad en metales inmovilizados, cromatografía de interacción hidrofóbica

(HIC), cromatografía de hidroxapatita, diálisis, cromatografía de afinidad, precipitación de sulfato de amonio, precipitación de etanol, HPLC fase reversa HPLC (RP-HPLC), isoenfoque, ultrafiltración, diafiltración, microfiltración y filtración en gel. En varias realizaciones, las etapas de cromatografía continúan con una etapa de filtración de virus, una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y/o una etapa de filtración de contaminantes microbianos.

[0020] La presente invención ofrece métodos para purificar un anticuerpo a partir de una solución con impurezas. En varias realizaciones, los métodos incluyen primero absorber el anticuerpo hasta un agente aglutinador Fc según se ha definido, seguido por el lavado del agente aglutinador Fc con una solución búfer con 0,5 hasta 3M CaCl₂ para eliminar una o más impurezas, y seguido de la recuperación del anticuerpo del agente aglutinador Fc en un búfer de elución con pH de 2-4 para producir un primer conjunto de eluyente.

[0021] En varias realizaciones, el proceso de purificación continúa sometiendo el primer conjunto de eluyente en una cromatografía de intercambio iónico mediante el contacto de la resina de intercambio iónico con el primer conjunto de eluyente de tal modo que la proteína objetivo no absorbe la resina, y mediante la recuperación de la proteína objetivo para producir un segundo conjunto de eluyente. En varias realizaciones, la etapa de cromatografía de intercambio iónico incluye además el lavado de la resina de intercambio iónico con una solución de lavado amortiguadora para recuperar al menos una porción de la proteína objetivo absorbida.

[0022] En varias realizaciones, el proceso de purificación continúa y se somete el segundo conjunto de eluyente a una cromatografía de interacción hidrofóbica mediante la absorción de la proteína objetivo a una resina de interacción hidrofóbica (p.ej., una fase sólida funcionalizada con ligandos hidrofóbicos), se lava la resina de interacción hidrofóbica con una solución de lavado amortiguadora con fuerza iónica que no eluye sustancialmente la proteína objetivo, y se recupera la proteína purificada objetivo (se suele usar un búfer de elución con una fuerza iónica lo suficientemente baja para liberar la proteína objetivo de la resina de interacción hidrofóbica).

[0023] En varios aspectos de las invenciones de las realizaciones preferidas, el agente aglutinador Fc queda inmovilizado en una fase sólida, que preferentemente se equilibra con un búfer adecuado antes de entrar en contacto con el líquido fuente. La fase sólida es, por lo general, agarosa que inmovilia el agente aglutinador Fc. En varias realizaciones, la columna se recupera con un reagente, como glicerol, para disminuir o impedir adherencia no específica a la columna.

[0024] En varias realizaciones, los anticuerpos purificados mediante los métodos de la presente invención pueden formularse en un excipiente farmacéutico aceptable y utilizado con fines diagnósticos, terapéuticos u otros usos conocidos para esas moléculas.

[0025] En varios aspectos, la presente invención aporta métodos para purificar la región Fc con anticuerpos a partir de una solución con la proteína y sus especies variables leídas por intrón (IRT). En aspectos destacados se utilizan métodos de la presente invención para reducir los niveles de uno o más especies variables leídas por intrón en una preparación de anticuerpo. En varias realizaciones, la proteína recuperada a partir del agente aglutinador Fc tiene un nivel de especies variables leídas por intrón que es al menos 5 veces menos que el nivel de variables leídas por intrón en el líquido fuente, y en algunas realizaciones, al menos 10 veces menos que el nivel de variables leídas por intrón en el líquido fuente. En varias realizaciones, las variables leídas por intrón incluyen menos del 1,0%, 0,8%, 0,5%, 0,2%, o 0,1% de las especies de esa proteína en la solución con esa proteína recuperada a partir del agente aglutinador Fc.

[0026] En varios aspectos, la presente invención aporta métodos para purificar la región Fc con anticuerpos a partir de una solución con la proteína y sus variables de peso molecular bajo (LMW). En aspectos destacados, se utilizan métodos de la presente invención para reducir los niveles de una o más especies variables de bajo peso molecular en una preparación de anticuerpos. En varias realizaciones, la proteína recuperada a partir del agente aglutinador Fc tiene un nivel de variables de peso molecular bajo que es al menos 5 veces menos que el nivel de las variables de peso molecular bajo en el líquido fuente, y en algunas realizaciones, es al menos 10 veces menos que el nivel de las variables de peso molecular bajo en el líquido fuente. En varias realizaciones, las variables de peso molecular bajo incluyen menos del 1,0%, 0,8%, 0,5%, 0,2%, o 0,1% de las especies de esa proteína en la solución con esa proteína recuperada a partir del agente aglutinador Fc.

[0027] En varios aspectos, la presente invención ofrece métodos para purificar una región Fc con anticuerpos a partir de una solución con la proteína y sus especies ligadas bajo disulfuro (UDB). En aspectos destacados, los métodos de la presente invención se utilizan para reducir de una o más especies variables ligadas bajo disulfuro en una preparación de anticuerpos. En varias realizaciones, la proteína recuperada a partir del agente aglutinador Fc tiene un nivel de especies variables ligadas bajo disulfuro que es al menos 5 veces inferior al nivel de las especies variables ligadas bajo disulfuro en el líquido fuente, y en algunas realizaciones, es al menos 10 veces inferior al nivel de las especies variables ligadas bajo disulfuro en el líquido fuente. En algunas realizaciones, las variables ligadas bajo disulfuro incluyen menos del 20%, 15%, 10%, 5%, 2% o 1% de las especies de esa proteína en la solución con esa proteína recuperada del agente aglutinador Fc.

[0028] En otro aspecto, la descripción pertenece a una región Fc con anticuerpos purificados según el método de la invención.

5 **[0029]** En otros aspectos, la presente invención aporta un tren de purificación para llevar a cabo cualquiera de los métodos que incluyen al menos las etapas para primero absorber la proteína hacia el agente aglutinador Fc, seguido del lavado del agente aglutinador Fc con una solución búfer con CaCl_2 para eliminar una o más impurezas, y luego recuperar la proteína del agente aglutinador Fc en un búfer de elución con un pH de 2-4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 **[0030]** Antes de describir la invención, sería útil entender las definiciones de algunos términos que se utilizarán aquí. Las definiciones aquí establecidas han sido agrupadas sólo para facilitar las referencias, pero sin limitarlas. Definiciones relacionadas con las proteínas

15 **[0031]** En varios aspectos, la presente invención ofrece métodos para purificar una región Fc con anticuerpos a partir de una solución con el anticuerpo y uno o más de sus variables leídas por intrón, como por ejemplo, variables leídas por intrón. En aspectos destacados, los métodos de la presente invención se utilizan para reducir los niveles de una o más especies variables leídas por intrón (IRT) en una preparación de anticuerpo. Los términos "variable leída por intrón" y "especie variable leída por intrón" se utilizan aquí alternativamente y hacen referencia al producto de un proceso en el que la síntesis de la región Fc con anticuerpos en cuestión (p.ej., la proteína objetivo), alargamiento de la cadena polipeptídica, se termina antes de la transcripción de una región codificadora mediante un codón finalizador en el intrón antes de la región codificadora. El resultado es una variable del anticuerpo en cuestión (p.ej., una variable leída por intrón) con uno o más dominios incompletos o faltantes. Esos intrones pueden contener uno o más codones finalizadores que posibilitan la producción de varios tipos de variables leídas por intrón.

25 **[0032]** El término "variables ligadas bajo disulfuro" o "UDB" hace referencia a cualquier especie en la que al menos falta un enlace de disulfuro. El enlace de disulfuro faltante puede ser un enlace de disulfuro intercadena o un enlace de disulfuro intracadena o una combinación de ambos.

30 **[0033]** El término "especies de peso molecular bajo" o especies LMW" hace referencia a variables de la región Fc con proteína que incluye una especie de proteína que consiste en una cadena pesada libre, una cadena ligera libre, especies IRT, media molécula, tres cuartos de molécula, o mezcla de ellos.

35 **[0034]** La Proteína A es una proteína de la pared celular de 42kD encontrada en la mayoría de deformaciones de Estafilococo áureo, que liga gran afinidad (alrededor de 10^{-8}M a la IgG humana) a la región Fc de anticuerpos. Según se usa aquí, el término "Proteína A" engloba la Proteína A recuperada a partir de su fuente nativa, la Proteína A producida sintéticamente (p.ej., mediante síntesis de péptido, por técnicas de recombinación, etc.) y variables de ellas que retienen la capacidad de ligar proteínas con una región CH2/CH3.

40 **[0035]** La Proteína G es una proteína de pared celular de los estreptococos del grupo G. La Proteína G es un tipo de receptor de Fc de tipo III que liga con una gran afinidad a la región Fc de anticuerpos, en particular, los anticuerpos de la IgG. Según se utiliza aquí, el término "Proteína G" engloba la Proteína G recuperada a partir de su fuente nativa, la Proteína G producida de forma sintética (p.ej., mediante síntesis de péptidos, mediante técnicas de recombinación, etc.), y variables de las que retienen la capacidad de ligar proteínas con una región Fc.

45 **[0036]** El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" (aquí se utilizan alternativamente) se refiere a una proteína de enlace a antígenos con una estructura de cadena de cuatro polipéptidos básica con dos cadenas ligeras y dos pesadas, donde esas cadenas se estabilizan, por ejemplo, mediante enlaces de disulfuro intercadenas, que poseen la capacidad de ligar antígeno de forma específica. Tanto las cadenas pesadas como las ligeras se doblan en dominios.

50 **[0037]** El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena pesada o ligera consistente en bucles de péptidos (p.ej., con entre 3 y 4 bucles de péptidos) estabilizados, por ejemplo, mediante una hoja plegada p y/o enlace de disulfuro intracadena. Los dominios aquí también se les adjetiva como "constantes" o "variables", basándose en la pérdida relativa de variación de secuencia dentro de los dominios de varios miembros de clase en el caso de un dominio "constante" o de variación significativa dentro de los dominios de varios miembros de clase en el caso de un dominio "variable". A los dominios "constantes" de las cadenas ligeras se les denomina de forma alternativa "regiones constantes de cadenas ligeras", "dominios constantes de cadenas ligeras", regiones "CL" o dominios "CL"). A los dominios constantes de la cadena pesada se les denomina de forma alternativa "regiones constantes de cadenas pesadas", "dominios constantes de cadenas pesadas" regiones "CH" o dominios "CH"). A los dominios "variables" de la cadena ligera se les denomina de forma alternativa "regiones variables de cadena ligera", "dominios variables de cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL"). A los dominios variables de la cadena pesada se les denomina de forma alternativa "regiones variables de cadena pesada", "dominios variables de cadena pesada" regiones "VH" o dominios "VH").

5 **[0038]** El término “fragmento” hace referencia a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpos consistente menos residuos de aminoácidos que los de un anticuerpo o cadena de anticuerpos intactos. Los fragmentos se pueden obtener a través del tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo completo o cadena de anticuerpos. Los fragmentos también se pueden obtener mediante recombinación. Entre los fragmentos ejemplares se incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, y/o fragmentos Fab. El término “fragmento de enlace a antígenos” hace referencia a un fragmento polipeptídico de inmunoglobina o un anticuerpo que liga antígenos o compite con el anticuerpo intacto del que fue derivado para ligar a antígenos específicos.

10 **[0039]** Los términos “proteína de fusión de anticuerpos” y “fusión de anticuerpos” hace referencia a una proteína de fusión que incluye todas o parte de las porciones de un anticuerpo fusionado con al menos una porción de proteína no-anticuerpo o polipéptido. La fusión suele realizarse mediante ingeniería genética del gen codificador de esa proteína. Algunas proteínas de fusión de anticuerpos ejemplares incluyen la porción de enlace de receptor celular de un anticuerpo (incluyendo la región Fc) fusionada con todas o parte de una porción de otra proteína soluble o proteína biológica celular, por ejemplo un receptor (celular o soluble) o porción de ellos, una citosina o porción de ella, una enzima o porción de ella, etc. Esas proteínas de fusión de anticuerpos que incluyen la región Fc del anticuerpo fusionado con otra proteína también reciben el nombre de proteínas de fusión Fc.

20 **[0040]** El término “agente aglutinador Fc” hace referencia a una molécula que es capaz de ligar la región Fc de un anticuerpo (p.ej., un anticuerpo IgG) incluyendo, pero sin limitación, una proteína de complemento, un receptor Fc o una proteína derivada de bacterias, como la Proteína A o la Proteína G, que posee gran afinidad para la región Fc de un anticuerpo.

25 **[0041]** El término “región Fc” se refiere a una región C-terminal de un anticuerpo IgG, en particular, la región C-terminal de la(s) cadena(s) de ese anticuerpo IgG. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, una región Fc suele definirse como que se prolonga desde el residuo de aminoácidos Cys226 hasta el carboxilo terminal de una(s) cadena(s) pesada(s) de IgG.

Definiciones relacionadas con la cromatografía

30 **[0042]** El término “líquido fuente” según se utiliza aquí, se refiere a un líquido con al menos una sustancia objetivo que se pretende purificar a partir de otras sustancias también presentes. Los líquidos fuente pueden, por ejemplo, ser soluciones acuosas, sistemas disolventes orgánicos, o mezclas o soluciones acuosas/disolvente orgánico. Los líquidos fuente suelen ser mezclas o soluciones complejas con diversas moléculas biológicas (como proteínas, anticuerpos, hormonas y virus), moléculas pequeñas (como sales, azúcares, lípidos, etc.) e incluso material particulado. Aunque un líquido fuente típico de origen biológico puede empezar como una solución o suspensión acuosa, también puede contener disolventes orgánicos utilizados en etapas de preparación anteriores como precipitaciones de disolvente, extracciones, etc. Algunos ejemplos de líquidos fuente pueden contener sustancias biológicas valiosas que son susceptibles para la purificación mediante diversas realizaciones que la presente invención incluye, aunque sin limitación, como cultivo supernatante a partir de un biorreactor, una suspensión celular homogeneizada, plasma, fracciones de plasma, y leche.

40 **[0043]** El término “sustancia objetivo” o “proteína objetivo” hace referencia aquí a una o más regiones Fc con proteínas a ser purificadas a partir del líquido fuente. La sustancia objetivo puede estar presente en el líquido fuente como una suspensión o en solución.

45 **[0044]** El término “impurezas” hace referencia a los materiales del líquido fuente que son diferentes de la sustancia objetivo y que se pretende excluir del producto de la sustancia objetivo final. Las impurezas típicas incluyen ácidos nucleicos, proteínas (incluyendo especies leídas por intrón, especies de bajo peso molecular y especies ligadas bajo disulfuro), péptidos, endotoxinas, virus y moléculas pequeñas.

50 **[0045]** Según se utiliza aquí, el término “fase sólida” se refiere a una matriz no acuosa con la que la sustancia objetivo interactúa durante la purificación o a la que se puede adherir el agente aglutinador Fc. Los materiales adecuados de la fase sólida incluyen, sin limitación, vidrio, sílice (p.ej., gel de sílice), polisacáridos (p.ej., una matriz de polisacáridos), como la agarosa y la celulosa, polímeros orgánicos como la poli(acrilamida), el metilmetacrilato, y copolímeros poliestireno-divinilbenceno como por ejemplo, la resina Amberlite™ (disponible en el mercado gracias a Rohm & Haas Chemical Co., Filadelfia, Pensilvania, EE.UU.). La fase sólida puede seleccionarse a partir de cualquiera de los grupos de resinas descritos comúnmente como resina de afinidad, de intercambio aniónico y de captura iónica. La fase sólida puede ser, por ejemplo, una columna de purificación, una fase discontinua de partículas discretas o una combinación de ambas. La fase sólida puede tener carácter poroso o no poroso, y puede ser comprimible o no. En varias realizaciones, la fase sólida es una matriz polimérica o una partícula o gotícula de agarosa. En varias realizaciones, la fase sólida puede cubrirse con un reagento (como el glicerol), por ejemplo, para impedir la adherencia no específica de impurezas a la fase sólida. Una fase sólida aglutinadora Fc sólo necesita poseer una química o un ligando asociado que permita al agente aglutinador Fc adherirse a la superficie de la fase sólida. Los materiales preferidos de la fase sólida pueden ser física y químicamente resilientes ante las condiciones empleadas en el proceso de purificación que incluya bombeo y filtración de flujo cruzado, y temperaturas, pH y otros aspectos de los líquidos empleados.

5 **[0046]** El “ligando de afinidad” hace referencia a un grupo que liga de forma selectiva o preferente un componente del líquido fuente a través de una interacción específica con una localización aglutinadora del componente. En la presente invención, el ligando de afinidad (p.ej., un agente aglutinador Fc) suele inmovilizarse hacia una fase sólida como una resina. Algunos ejemplos de ligandos de afinidad que pueden ligarse al soporte de la resina para ofrecer resinas de cromatografía útiles en el proceso de la presente invención son, sin limitación, la Proteína A, Proteína G, y sus análogas, que ligan de forma selectiva a una región Fc proteica. Los métodos de aglutinar ligandos de afinidad a materiales de soporte sólido son bien conocidos en el ámbito de la purificación. Véase, p.ej., los testos de referencia Separaciones de afinidad: un enfoque práctico (Practical Approach Series), Paul Matejschuk (Editor), Irl Pr: 1997; y Cromatografía de afinidad, Herbert Schott, Marcel Dekker, Nueva York: 1997.

[0046] La “resina de cromatografía de afinidad” o “resina de afinidad” hace referencia a una resina de cromatografía que incluye una fase sólida o substrato con ligandos de afinidad ligados a sus superficies.

15 **[0048]** La “resina de cromatografía de intercambio iónico” o la “resina de intercambio iónico” hacen referencia a un soporte sólido a los ligandos enlazados de forma no covalente que poseen una carga positiva o negativa, y tienen contraiones libres disponibles para su intercambio con iones en una solución con la que está en contacto la resina de intercambio iónico.

20 **[0049]** Las “resinas de intercambio catiónico” hacen referencia a una resina de intercambio catiónico con ligandos cargados negativamente y ligados de forma covalente, con cationes libres para su intercambio con cationes en una solución con la que está en contacto la resina. Se conocen una gran variedad de resinas de intercambio catiónico, por ejemplo, aquellas en las que los grupos enlazados de forma covalente son carboxilato o sulfonato. Las resinas de intercambio catiónico disponibles en el mercado incluyen CMC-celulosa, SP-Sphadex™, y Fast S-Sepharose™ (los últimos dos comercializados por Pharmacia).

25 **[0050]** Las “resinas de intercambio aniónico” hacen referencia a una resina de intercambio iónico con grupos cargados positivamente y ligados de forma covalente, como grupos de amino cuaternarios. Las resinas de intercambio aniónico disponibles en el mercado incluyen celulosa DEAE, TMAE, QAE Sephadex™ y Fast Q Sepharose™ (los dos últimos comercializados por Pharmacia).

30 **[0051]** Según se utiliza aquí, el término “sal caotrópica” se refiere a una sal que incluye uno o más componentes iónicos que son bajos en series liotrópicas que pueden penetrar en las cáscaras hidrofóbicas de las proteínas y ligarse directamente a sus superficies. Esto deteriora la asociación cohidrativa, favoreciendo la solubilización de la proteína. Algunos ejemplos de sales caotrópicas incluyen, sin limitación, sales de haluro de los elementos del Grupo II (p.ej., cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de bario, bromuro de calcio, bromuro de magnesio, bromuro de bario, yoduro de calcio, yoduro de magnesio, yoduro de bario).

35 **[0052]** Algunos ejemplos de sales catiónicas divalentes apropiadas incluyen, sin limitación, sales de Mn_2^+ , Ni_2^+ , Mg_2^+ , Ca_2^+ y Ba_2^+ con tiocianato (SCN^-), perclorato (ClO_4^-), nitrato (NO_3^-), cloruro (Cl^-) y bromuro (Br^-), y combinaciones entre ellos.

40 **[0053]** En algunas realizaciones, las sales catiónicas divalentes incluyen un catión divalente (p.ej., Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} o Ba^{2+}). Las sales caotrópicas preferidas para su uso en los procesos descritos son $MgCl_2$, $NiCl_2$ y $CaCl_2$. Tras la etapa de lavado de la sal catiónica divalente, la proteína objetivo se eluye a partir de la matriz de cromatografía de afinidad.

45 **[0054]** Un “búfer” o “amortiguador” es una sustancia que, mediante su presencia en solución, aumenta la cantidad de ácido o alcalinos que debe añadirse para un cambio en la unidad de pH. Una solución amortiguadora resiste los cambios de pH mediante la acción de sus componentes conjugados de ácido-base. Las soluciones amortiguadoras para uso con reagentes biológicos suelen poder mantener una concentración constante de iones de hidrógeno de tal modo que el pH de la solución se encuentra dentro de un rango fisiológico. El término “pH fisiológico” hace referencia al pH de la sangre de mamíferos (p.ej., 7,38 o 7,4 aproximadamente). De este modo, un rango de pH fisiológico se encuentra entre el 7,2 y el 7,6. Los componentes búfer o amortiguadores tradicionales incluyen, sin limitación, sales orgánicas e inorgánicas, ácidos y bases. Algunos ejemplos de búferes para su uso en la purificación de moléculas biológicas (p.ej., moléculas de proteínas) incluyen el zwitterión o Búferes “buenos”, véase p.ej., Good et al. (1966) Biochemistry 5:467 y Good and Izawa (1972) Methods Enzymol. 24:62. Algunos ejemplos de búferes incluyen, sin limitación, TES, MES, PIPES, HEPES, MOPS, MOPSO, TRICINE y BICINE.

50 **[0055]** El “búfer de equilibrio” según el presente texto es un búfer utilizado para preparar el reagente aglutinador Fc, la fase sólida, o ambos, para cargar el líquido fuente con la proteína objetivo. El búfer de equilibrio es preferiblemente isotónico y suele tener un pH entre 6 y 8 aproximadamente. El “búfer de carga” es un búfer utilizado para cargar el líquido fuente con la región Fc que contiene la proteína y las impurezas en la fase sólida donde se inmoviliza el agente aglutinador Fc. A menudo, los búferes de equilibrio y carga son los mismos. El “búfer de elución” se utiliza para eluir la región Fc con la proteína del agente aglutinador Fc inmovilizado. Preferentemente, el búfer de elución tiene un bajo pH de entre 2 y 5, preferiblemente entre 3 y 4. Algunos ejemplos de búferes que controlarán el pH dentro de este rango incluyen los búferes de glicina, fosfato, acetato, citrato y amonio, además de

combinaciones entre ellos. Los búferes preferidos de entre los anteriores son los de citrato y acetato, por lo general, búferes de citrato de sodio o de acetato de sodio. Se contemplan otros búferes de elución, incluyendo búferes con pH alto (p.ej., los que tienen un pH de 9 o más) o búferes con un compuesto o composición como $MgCl_2$ (2mM) para eluir la proteína en cuestión.

5 [0056] El "líquido de lavado" o "búfer de lavado" según se utilizan aquí se refieren al líquido empleado para transportar las impurezas de la resina de cromatografía a la que se liga la sustancia objetivo. Se pueden emplear varios líquidos de lavado de forma secuencial, p.ej., con los líquidos de lavado sucesivos que tienen propiedades variables como pH, conductividad, concentración de disolvente, etc., diseñados para disociar y eliminar tipos variables de impurezas que no están asociadas específicamente con la resina de cromatografía.

10 [0057] El "líquido de elución" o "búfer de elución" se refiere aquí al líquido que se emplea para disociar la sustancia objetivo a partir de la resina de cromatografía una vez que ha sido lavada con uno o más líquidos de lavado. El líquido de elución actúa para disociar la sustancia objetivo sin desnaturalizarla de forma irreversible. Los líquidos de elución típicos son bien conocidos en el ámbito de la cromatografía y pueden tener altas concentraciones de sales, ligandos o análogos de afinidad libre, u otras sustancias que mejoran la disociación de la sustancia objetivo de la resina de cromatografía. Las "condiciones de elución" hacen referencia a las condiciones de proceso impuestas a la resina de cromatografía ligada a la sustancia objetivo que disocia la sustancia objetivo de la resina de cromatografía, como el contacto de la resina de cromatografía ligada con la sustancia objetivo con un líquido de elución o un búfer de elución para producir esa disociación.

15 [0058] El "líquido limpiador" o el "búfer limpiador" se refiere al líquido que se utiliza para lavar la resina de cromatografía tras la finalización del proceso de purificación. El líquido limpiador puede contener un detergente, un agente inactivador vírico, o relativamente altas concentraciones de sales, y puede tener un pH superior o inferior que los líquidos utilizados durante el proceso de purificación. Su objetivo consiste en descontaminar la resina de cromatografía para dejarla lista para su reutilización. Los líquidos limpiadores típicos son bien conocidos en el campo de la cromatografía.

20 [0059] El "líquido de almacenamiento" o "búfer de almacenamiento" hace referencia aquí al líquido en el que se suspende la resina de cromatografía entre usos. Los líquidos de almacenamiento, junto con los iones amortiguadores, pueden contener también microbicidas y otros conservantes. Los líquidos de almacenamiento son bien conocidos en el campo de la cromatografía.

25 [0060] En algunos aspectos, la presente invención describe métodos para purificar un anticuerpo con una región Fc a partir de un líquido fuente que consta de la proteína y una o más impurezas mediante la absorción del anticuerpo a un agente aglutinador Fc según se describe aquí, seguido del lavado del agente aglutinador Fc con una solución amortiguadora con entre 0,5 hasta 3M $CaCl_2$, eliminar una o más impurezas y posteriormente recuperar el anticuerpo del agente aglutinador Fc. Algunos agentes aglutinadores Fc son la Proteína A y la Proteína G.

30 [0061] La presente invención describe procesos para la purificación de una región Fc con anticuerpos. Algunos ejemplos de procesos de purificación incluyen una etapa de cromatografía de afinidad. La etapa de cromatografía de afinidad puede ser continua, discontinua, o una combinación de ambas. Por ejemplo, la etapa de cromatografía de afinidad puede llevarse a cabo como un proceso discontinuo, como puede ser un proceso por lotes. La cromatografía de afinidad es el proceso de absorción ofbioselectiva y posterior recuperación de un compuesto objetivo a partir de un ligando inmovilizado. Este proceso permite la purificación altamente específica y eficaz del compuesto objetivo. El proceso requiere la utilización de un ligando selectivo adecuado (p.ej., un agente aglutinador Fc) que ligará el compuesto objetivo (p.ej., proteína con región Fc) generalmente con una constante de disociación entre 10^{-4} a 10^{-8} , permitiendo la recuperación en condiciones medias. El ligando suele ser inmovilizado con una matriz granulada y porosa que puede encontrarse en forma de un medio de absorción por lotes o por relleno de columna.

35 [0062] La Proteína A constituye un agente aglutinador preferido. La Proteína A liga la región Fc de inmunoglobulinas. La Proteína A consta de seis regiones, cinco de las cuales ligan IgG. La liga con alta afinidad a IgG_1 , IgG_2 e IgG_4 humana, además de IgG_{2a} , IgG_{2b} e IgG_3 de ratón. La proteína A liga con afinidad moderada la IgD, IgM, IgA y la IgE humana además de la IgG_1 de ratón. Como ligando de afinidad, la Proteína A queda inmovilizada a una matriz de tal modo que esas regiones quedan libres para ligar. Una molécula de Proteína A inmovilizada puede ligar al menos dos moléculas de IgG. Las versiones nativa y recombinante de la Proteína A comparten una especificidad similar para la región Fc de la IgG. La Proteína A recombinante puede ser diseñada para incluir, por ejemplo una cisteína C-terminal, y puede inmovilizarse a través de agrupamientos tioéster hacia una matriz de base sólida. Esas agrupaciones dan lugar a una capacidad de enlace mejorado de la Proteína A.

40 [0063] Una alternativa de agente aglutinador es la Proteína G. La proteína G es específica para la IgG, ligando con alta afinidad la IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 e IgG_4 humana, además de la IgG_1 y la IgG_3 de ratón. La proteína G Plus tiene una afinidad moderada con la IgG_4 humana y con la IgG_{2a} , IgG_{2b} e IgG_3 de ratón. La Proteína G recombinante puede diseñarse para eliminar la región de enlace de albúmina de la proteína nativa. La proteína G recombinante contiene dos regiones de enlace Fc.

- 5 **[0064]** Un agente aglutinador alternativo es la Proteína A/G. La proteína A/G es una proteína diseñada genéticamente que combina los perfiles aglutinadores de la IgG tanto de la Proteína A como de la Proteína G. Se trata de un producto de fusión de genes secretados a partir de una forma no patogénica de *Bacillus*. La proteína A/G contiene cuatro dominios de enlace Fc de la Proteína A y dos de la Proteína G. La Proteína A/G no depende tanto del pH como la proteína A, pero cuenta con las propiedades añadidas de las Proteínas A y G.
- 10 **[0065]** La Proteína A/G liga con todas las subclases de la IgG humana, siendo particularmente adecuada para la purificación de anticuerpos policlonales o monoclonales de la IgG, cuyas subclases no han sido determinadas. Además, liga con la IgA, IgE, IgM y (en menor medida) con la IgD. La proteína A/G también liga bien con todas las subclases de IgG de ratón, siendo especialmente adecuada para la purificación de subclases de la IgG de anticuerpos monoclonales de ratón, sin interferencia de la IgA, IgM y la albúmina sérica murina. (Véase p.ej., Sikkema. (1989) *Amer. Biotech. Lab* 7, 42.). Las subclases individuales de monoclonales de ratón pueden tener una afinidad más fuerte con la proteína A/G quimérica que con la Proteína A o la Proteína G. (Véase p.ej., Eliasson et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 4323-4327.).
- 15 **[0066]** En la presente invención, el agente aglutinador Fc inmovilizado (p.ej., Proteína A) se lava con una solución CaCl_2 para eliminar impurezas. En particular, se ha descubierto que las impurezas no deseadas producidas como resultado de las tecnologías de expresión de anticuerpos recombinantes pueden eliminarse mediante una etapa de lavado con CaCl_2 .
- 20 **[0067]** Los métodos de la presente invención pueden incluir de forma opcional etapas de purificación posteriores a la cromatografía de afinidad y la etapa de lavado de catión divalente. Posteriores etapas de purificación pueden incluir una etapa de cromatografía de intercambio iónico y/o una etapa de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). Posteriores etapas de cromatografía pueden ser continuas, discontinuas (p.ej., como un proceso por lotes), o una combinación de ambas. La cromatografía de intercambio iónico separa las moléculas basadas en diferencias entre la carga global de las proteínas. La proteína objetivo debe tener una carga opuesta que la del grupo funcional adjunto a la resina para ligar. Por ejemplo, los anticuerpos, que generalmente tienen una carga positiva global, ligarán mejor con intercambiadores catiónicos, que contienen grupos funcionales cargados negativamente. Debido a que la interacción es iónica, la unión debe tener lugar en condiciones iónicas bajas. La elución se consigue mediante el aumento de la fuerza iónica para romper la interacción iónica o mediante el cambio del pH de la proteína.
- 25 **[0068]** Mientras que la cromatografía de intercambio iónico depende de las cargas de las proteínas para aislarlas, la cromatografía de interacción hidrofóbica utiliza las propiedades hidrofóbicas de algunas proteínas. Los grupos hidrofóbicos de la proteína ligan con grupos hidrofílicos en la columna. Cuanto más hidrofóbica es una proteína, mejor ligará con la columna. La etapa HIC elimina, por ejemplo, impurezas derivadas de la célula huésped (p.ej., ADN y otras especies relacionadas con productos de alto y bajo peso molecular). Otras etapas de purificación pueden incluir etapas que eliminen virus además de etapas de ultrafiltración y/o diafiltración, según se describe aquí.
- 30 **[0069]** La región Fc con proteína es un anticuerpo o una proteína de fusión de anticuerpos con una región Fc que liga con un receptor Fc del agente aglutinador Fc. El uso de la solución amortiguadora con CaCl_2 para lavar el agente aglutinador Fc permite una eliminación mayor de impurezas, como por ejemplo, variables leídas y regiones constantes con fragmentos (incluyendo especies LMW y UDB), de la proteína en cuestión (p.ej., la sustancia objetivo en el líquido fuente).
- 35 **[0070]** Los métodos de la presente invención incluyen una o más etapas de separación cromatográfica además y pueden incluir una o más etapas de filtración para separar el anticuerpo con una región Fc ("la proteína objetivo") de las impurezas en un líquido fuente. Por ejemplo, el líquido fuente puede filtrarse, centrifugarse o procesarse de cualquier otro modo para eliminar restos particulados y similares antes de poner en contacto el líquido fuente con el agente aglutinador Fc. Por ejemplo, mediante el uso de técnicas de recombinación se pueden producir proteínas de forma intracelular en el espacio periplásmico, o secretadas directamente en el medio de cultivo. Si se produce la proteína de forma intracelular, los restos particulados, bien células huésped o fragmentos lisados, pueden eliminarse, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Si la proteína es secretada al medio, las células huésped recombinantes pueden separarse del medio de cultivo celular, por ejemplo, por filtración de flujo tangencial.
- 40 **[0071]** En varias realizaciones, el líquido fuente con la proteína objetivo entra en contacto con el agente aglutinador Fc (preferiblemente inmovilizado en una fase sólida y equilibrado con un amortiguador adecuado) de tal modo que la proteína objetivo se absorbe hacia el agente aglutinador Fc (p.ej., un agente aglutinador Fc inmovilizado). El líquido fuente entra en contacto con el agente aglutinador Fc (p.ej., un agente aglutinador Fc inmovilizado) en un búfer de carga que puede ser el mismo que el búfer de equilibrio. A medida que el líquido fuente con las impurezas fluye a través de la fase sólida, la proteína objetivo es absorbida al agente aglutinador Fc y otras impurezas (como las proteínas de las células huésped, donde se produce la proteína objetivo en una célula huésped recombinante, u otras impurezas derivadas del proceso) se canalizan o ligan de forma no específica hacia la fase sólida. En varias realizaciones, el agente aglutinador Fc es la Proteína A, y el búfer de equilibrio puede ser 20 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,5. Otros búferes de equilibrio adecuados incluyen, por ejemplo, BIS, HEPES, etc., en concentraciones fisiológicas, por ejemplo, una concentración con entre 0,5 mM y 100mM aproximadamente (p.ej., 10mM, 20mM, 50mM, etc.), y concentraciones de sales fisiológicas (p.ej., alrededor de 0,15 mM NaCl), y con un pH de 5,0 a 9,0.
- 45 **[0070]** Los métodos de la presente invención incluyen una o más etapas de separación cromatográfica además y pueden incluir una o más etapas de filtración para separar el anticuerpo con una región Fc ("la proteína objetivo") de las impurezas en un líquido fuente. Por ejemplo, el líquido fuente puede filtrarse, centrifugarse o procesarse de cualquier otro modo para eliminar restos particulados y similares antes de poner en contacto el líquido fuente con el agente aglutinador Fc. Por ejemplo, mediante el uso de técnicas de recombinación se pueden producir proteínas de forma intracelular en el espacio periplásmico, o secretadas directamente en el medio de cultivo. Si se produce la proteína de forma intracelular, los restos particulados, bien células huésped o fragmentos lisados, pueden eliminarse, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Si la proteína es secretada al medio, las células huésped recombinantes pueden separarse del medio de cultivo celular, por ejemplo, por filtración de flujo tangencial.
- 50 **[0071]** En varias realizaciones, el líquido fuente con la proteína objetivo entra en contacto con el agente aglutinador Fc (preferiblemente inmovilizado en una fase sólida y equilibrado con un amortiguador adecuado) de tal modo que la proteína objetivo se absorbe hacia el agente aglutinador Fc (p.ej., un agente aglutinador Fc inmovilizado). El líquido fuente entra en contacto con el agente aglutinador Fc (p.ej., un agente aglutinador Fc inmovilizado) en un búfer de carga que puede ser el mismo que el búfer de equilibrio. A medida que el líquido fuente con las impurezas fluye a través de la fase sólida, la proteína objetivo es absorbida al agente aglutinador Fc y otras impurezas (como las proteínas de las células huésped, donde se produce la proteína objetivo en una célula huésped recombinante, u otras impurezas derivadas del proceso) se canalizan o ligan de forma no específica hacia la fase sólida. En varias realizaciones, el agente aglutinador Fc es la Proteína A, y el búfer de equilibrio puede ser 20 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,5. Otros búferes de equilibrio adecuados incluyen, por ejemplo, BIS, HEPES, etc., en concentraciones fisiológicas, por ejemplo, una concentración con entre 0,5 mM y 100mM aproximadamente (p.ej., 10mM, 20mM, 50mM, etc.), y concentraciones de sales fisiológicas (p.ej., alrededor de 0,15 mM NaCl), y con un pH de 5,0 a 9,0.
- 55 **[0071]** En varias realizaciones, el líquido fuente con la proteína objetivo entra en contacto con el agente aglutinador Fc (preferiblemente inmovilizado en una fase sólida y equilibrado con un amortiguador adecuado) de tal modo que la proteína objetivo se absorbe hacia el agente aglutinador Fc (p.ej., un agente aglutinador Fc inmovilizado). El líquido fuente entra en contacto con el agente aglutinador Fc (p.ej., un agente aglutinador Fc inmovilizado) en un búfer de carga que puede ser el mismo que el búfer de equilibrio. A medida que el líquido fuente con las impurezas fluye a través de la fase sólida, la proteína objetivo es absorbida al agente aglutinador Fc y otras impurezas (como las proteínas de las células huésped, donde se produce la proteína objetivo en una célula huésped recombinante, u otras impurezas derivadas del proceso) se canalizan o ligan de forma no específica hacia la fase sólida. En varias realizaciones, el agente aglutinador Fc es la Proteína A, y el búfer de equilibrio puede ser 20 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,5. Otros búferes de equilibrio adecuados incluyen, por ejemplo, BIS, HEPES, etc., en concentraciones fisiológicas, por ejemplo, una concentración con entre 0,5 mM y 100mM aproximadamente (p.ej., 10mM, 20mM, 50mM, etc.), y concentraciones de sales fisiológicas (p.ej., alrededor de 0,15 mM NaCl), y con un pH de 5,0 a 9,0.
- 60 **[0071]** En varias realizaciones, el líquido fuente con la proteína objetivo entra en contacto con el agente aglutinador Fc (preferiblemente inmovilizado en una fase sólida y equilibrado con un amortiguador adecuado) de tal modo que la proteína objetivo se absorbe hacia el agente aglutinador Fc (p.ej., un agente aglutinador Fc inmovilizado). El líquido fuente entra en contacto con el agente aglutinador Fc (p.ej., un agente aglutinador Fc inmovilizado) en un búfer de carga que puede ser el mismo que el búfer de equilibrio. A medida que el líquido fuente con las impurezas fluye a través de la fase sólida, la proteína objetivo es absorbida al agente aglutinador Fc y otras impurezas (como las proteínas de las células huésped, donde se produce la proteína objetivo en una célula huésped recombinante, u otras impurezas derivadas del proceso) se canalizan o ligan de forma no específica hacia la fase sólida. En varias realizaciones, el agente aglutinador Fc es la Proteína A, y el búfer de equilibrio puede ser 20 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,5. Otros búferes de equilibrio adecuados incluyen, por ejemplo, BIS, HEPES, etc., en concentraciones fisiológicas, por ejemplo, una concentración con entre 0,5 mM y 100mM aproximadamente (p.ej., 10mM, 20mM, 50mM, etc.), y concentraciones de sales fisiológicas (p.ej., alrededor de 0,15 mM NaCl), y con un pH de 5,0 a 9,0.
- 65 **[0071]** En varias realizaciones, el líquido fuente con la proteína objetivo entra en contacto con el agente aglutinador Fc (preferiblemente inmovilizado en una fase sólida y equilibrado con un amortiguador adecuado) de tal modo que la proteína objetivo se absorbe hacia el agente aglutinador Fc (p.ej., un agente aglutinador Fc inmovilizado). El líquido fuente entra en contacto con el agente aglutinador Fc (p.ej., un agente aglutinador Fc inmovilizado) en un búfer de carga que puede ser el mismo que el búfer de equilibrio. A medida que el líquido fuente con las impurezas fluye a través de la fase sólida, la proteína objetivo es absorbida al agente aglutinador Fc y otras impurezas (como las proteínas de las células huésped, donde se produce la proteína objetivo en una célula huésped recombinante, u otras impurezas derivadas del proceso) se canalizan o ligan de forma no específica hacia la fase sólida. En varias realizaciones, el agente aglutinador Fc es la Proteína A, y el búfer de equilibrio puede ser 20 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,5. Otros búferes de equilibrio adecuados incluyen, por ejemplo, BIS, HEPES, etc., en concentraciones fisiológicas, por ejemplo, una concentración con entre 0,5 mM y 100mM aproximadamente (p.ej., 10mM, 20mM, 50mM, etc.), y concentraciones de sales fisiológicas (p.ej., alrededor de 0,15 mM NaCl), y con un pH de 5,0 a 9,0.

- 5 [0072] La fase sólida suele ser una gotícula o partícula de agarosa (p.ej., sefarosa) para inmovilizar el agente aglutinador Fc. En varias realizaciones se recubre la columna con un reagente, como el glicerol, para disminuir o impedir la adherencia no específica a la columna. En diversas realizaciones, el agente aglutinador Fc es la proteína A. La columna de Flujo Rápido (FF) Proteína A Sepharose™ rmp, disponible en el mercado gracias a Amersham Biosciences, es un ejemplo de una columna de Proteína A adecuada para su uso en las metodologías descritas.
- 10 [0073] El agente aglutinador Fc se lava con una solución de lavado amortiguadora con CaCl₂ para eliminar especies variables de proteína ligadas a la fase sólida o agente aglutinador Fc. En particular, se ha descubierto que el uso de una etapa de lavado con CaCl₂ puede eliminar una cantidad significativa de impurezas no deseadas. De forma específica, se ha descubierto que las variables leídas por intrón, las variables de bajo peso molecular y las variables ligadas bajo disulfuro de una proteína objetivo pueden eliminarse utilizando un lavado con CaCl₂. Además, la proteína de células huésped (HCP) y el ADN también pueden eliminarse utilizando el lavado con sales catiónicas divalentes. En varias realizaciones, la sal catiónica divalente puede estar presente en la solución de lavado, en varias realizaciones pueden utilizarse dos o más sales catiónicas divalentes.
- 15 [0074] En varias realizaciones se utilizan las soluciones de lavado además de CaCl₂ con solución de lavado para eliminar impurezas. Por ejemplo, en varias realizaciones se utiliza una solución de 20 a 50 mM Tris, 0,75 a 2,0 M NaCl, pH de 5,0 a 9,0, y/o una solución mM Tris, con pH de 7,5 para lavar el agente aglutinador Fc antes de, después de, o ambos, lavar el agente aglutinador Fc con la solución de lavado con CaCl₂.
- 20 [0075] En varias realizaciones se suele añadir el CaCl₂ en la concentración entre 0,5M y 2,5M aproximadamente a una solución amortiguadora con un pH entre 5 y 9, y preferiblemente con un pH entre 7 y 8. Las concentraciones preferidas de CaCl₂ incluyen, sin limitación, 0,6M, 2,0M y 2,5M. Los búferes adecuados a estos efectos incluyen, sin limitación, búferes Tris o de acetato en una concentración desde 20 a 50 mM.
- 25 [0076] Tras una o varias etapas de lavado, se recupera la proteína objetivo a partir del agente aglutinador Fc. Esto se suele lograr utilizando un búfer de elución adecuado. La proteína objetivo se eluye a partir de la columna utilizando un búfer de elución con un pH bajo, entre 2 y 4 aproximadamente, y preferentemente entre 2,5 y 3,5.
- 30 [0077] En varias realizaciones, el anticuerpo objetivo así recuperado puede formularse en un excipiente farmacéutico aceptable y utilizarse para usos diagnósticos, terapéuticos u otros conocidos para esas moléculas.
- 35 [0078] En varias realizaciones, la preparación eluida de anticuerpo objetivo puede someterse a etapas de purificación adicionales después de la etapa de la cromatografía del agente aglutinador Fc. Por ejemplo, algunos ejemplos de etapas de purificación adicionales incluyen, sin limitación: la cromatografía de intercambio aniónico, la cromatografía de intercambio catiónico, la cromatografía de intercambio hidrofóbico (HIC), la cromatografía de hidroxapatita, diálisis, cromatografía de afinidad (incluyendo cromatografía de afinidad metálica inmovilizada), cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), precipitación de sulfato de amonio, precipitación de etanol, fase HPLC reversa (RP-HPLC), isoenfoque, ultrafiltración, diafiltración y filtración en gel. En varias realizaciones, la etapa de cromatografía del agente aglutinador Fc continúa con una etapa de filtración de virus, una etapa de ultrafiltración/diafiltración y una etapa de filtración de contaminantes microbianos. En varias realizaciones, estas etapas adicionales de purificación pueden llevarse a cabo antes de la etapa de cromatografía del agente aglutinador Fc. En varios aspectos, los métodos aquí descritos implican purificar una región Fc con anticuerpos de impurezas mediante cromatografía de Proteína A.
- 40 [0079] En varias realizaciones, los métodos de purificación de una región Fc con anticuerpo (la proteína objetivo) empiezan con la absorción de la proteína objetivo hacia un agente aglutinador Fc que consta de Proteína A inmovilizada sobre una fase sólida, seguido del lavado del agente aglutinador Fc con una solución amortiguadora con CaCl₂ para eliminar una o más impurezas, para posteriormente recuperar la proteína a partir de la Proteína A para producir un primer conjunto de eluyente.
- 45 [0080] En varias realizaciones, el proceso de purificación sigue con el sometimiento del primer conjunto de eluyente a una cromatografía de intercambio aniónico mediante la puesta en contacto de una resina de intercambio aniónico con el primer conjunto de eluyente de tal modo que las impurezas son absorbidas por la resina, mientras que la proteína objetivo no resulta absorbida por la resina. De este modo, la proteína objetivo puede recuperarse del flujo para producir un segundo conjunto de eluyente. En varias realizaciones, la etapa de cromatografía de intercambio aniónico incluye además el lavado de la resina de intercambio aniónico con una solución amortiguadora de lavado para recuperar al menos una porción de la proteína objetivo absorbida, que podría combinarse con el segundo conjunto de eluyente. De forma alternativa, el primer conjunto de eluyente puede ponerse en contacto con la resina de intercambio aniónico de tal modo que se absorba el anticuerpo, permitiendo canalizarse las impurezas, seguido opcionalmente del lavado y elución del anticuerpo absorbido.
- 50 [0081] En varias realizaciones, el proceso de purificación continúa con el sometimiento del segundo conjunto de eluyente a una HIC mediante la absorción de la proteína objetivo a una resina de interacción hidrofóbica (p.ej., una fase sólida funcional con ligandos hidrofóbicos), lavando la resina de interacción hidrofóbica con una solución amortiguadora de lavado con una fuerza iónica que no eluye sustancialmente la proteína objetivo, y recuperando la
- 55
- 60
- 65

proteína objetivo (por lo general, utilizando un búfer de elución con una fuerza iónica lo suficientemente baja como para liberar la proteína objetivo de la resina de interacción hidrofóbica) en un tercer conjunto de eluyente.

5 **[0082]** En varias realizaciones, el proceso de purificación incluye una o más etapas de filtración, por ejemplo, para eliminar virus, concentrar y amortiguar la solución con la proteína objetivo y para eliminar contaminantes microbianos.

10 **[0083]** En varias realizaciones, la presente invención aporta métodos para la purificación de un anticuerpo con una región Fc a partir de un líquido fuente que consta del anticuerpo y una o más impurezas donde las impurezas constan a su vez de una o más variables IRT. En una realización, los métodos ofrecen desde 2 hasta 20 veces una reducción en los niveles variables de IRT a partir de los del líquido fuente. Preferentemente, los niveles variables de IRT se reducen al menos en 5 veces, y más preferiblemente, los niveles de variables IRT se reducen al menos en 10 veces. Por ejemplo, en un líquido fuente (muestra de inicio) con alrededor de un 3-5% de variables de anticuerpos IRT (como un porcentaje de especies totales en el líquido fuente), las especies variables de anticuerpos IRT pueden reducirse entre un 0,3 y un 0,5% aproximadamente. En varias realizaciones, las especies variables IRT se reducen a: menos del 1%, menos del 0,8%, menos del 0,5%, menos del 0,3%, menos del 0,2%, y/o menos del 0,1%. Preferentemente, en la purificación de un líquido fuente para la preparación de una proteína, las variables IRT se reducen a: menos del 1%, menos del 0,8%, menos del 0,5%, menos del 0,3%, menos del 0,2%, y/o menos del 0,1% como un porcentaje del total de especies en el líquido fuente.

20 **[0084]** En varias realizaciones, la presente invención aporta métodos para la purificación de un anticuerpo con una región Fc a partir de un líquido fuente que consta de un anticuerpo y una o más impurezas donde las impurezas constan, a su vez, de una o más variables LMW. En una realización, los métodos ofrecen entre 2 y 20 veces una reducción en los niveles de variables de LMW de los que tiene el líquido fuente. Preferiblemente, los niveles variables de LMW se reducen al menos 5 veces, y más preferiblemente, los niveles variables de LMW se reducen al menos 10 veces.

25 **[0085]** Por ejemplo, en un líquido fuente (muestra de inicio) con entre un 20% de variables de anticuerpos UDB (como porcentaje de las especies totales en el líquido fuente), las especies variables de anticuerpos UDB pueden reducirse entre al 10% y al 2% aproximadamente. En algunas realizaciones, las especies variables UDB se reducen a: menos del 20%, menos del 15%, menos del 10%, menos del 5%, menos del 2%, o menos del 1%. Preferiblemente, en la purificación de un líquido fuente para la preparación de una proteína, las variables UDB se reducen a: menos del 20%, menos del 15%, menos del 10%, menos del 5%, menos del 2% o menos del 1% como un porcentaje de las especies totales en el líquido fuente.

30 **[0086]** Por ejemplo, en un líquido fuente (muestra de inicio) con entre un 3 y un 5% de variables de anticuerpos LMW (como un porcentaje total de las especies en el líquido fuente), las especies variables de anticuerpos LMW se reducen a un 0,3% y un 0,5% aproximadamente. En varias realizaciones, las especies variables de LMW se reducen a: menos del 1%, menos del 0,8%, menos del 0,5%, menos del 0,3%, menos del 0,2% y/o menos del 0,1%. Preferentemente, en la purificación de un líquido fuente para la preparación de una proteína, las variables LMW se reducen a: menos del 1%, menos del 0,8%, menos del 0,5%, menos del 0,3%, menos del 0,2% y/o menos del 0,1%, como un porcentaje de las especies totales en el líquido fuente.

35 **[0087]** En varias realizaciones, la presente invención aporta métodos para la purificación de un anticuerpo con una región Fc a partir de un líquido fuente que consta de un anticuerpo y una o más impurezas donde las impurezas constan, a su vez, de una o más variables UDB. En una realización, los métodos aportan entre 2 y 20 veces una reducción en los niveles variables de UDB de los del líquido fuente. Preferiblemente, los niveles de variables UDB se reducen al menos 5 veces y más preferiblemente, los niveles de variables UDB se reducen al menos 10 veces aproximadamente.

40 **[0088]** Por ejemplo, en un líquido fuente (muestra de inicio) con un 20% de variables de anticuerpos UDB (como un porcentaje del total de especies en el líquido fuente), las especies variables de anticuerpos UDB pueden reducirse hasta el 10% o el 2% aproximadamente. En varias realizaciones, las especies variables UDB se reducen a: menos del 20%, menos del 15%, menos del 10%, menos del 5%, menos del 2%, o menos del 1%. Preferentemente, en la purificación de un líquido fuente para la preparación de una proteína, las variables UDB se reducen a: menos del 20%, menos del 15%, menos del 10%, menos del 5%, menos del 2%, o menos del 1% como un porcentaje del total de especies en el líquido fuente.

45 **[0089]** También, por ejemplo, en un líquido fuente (muestra de inicio) con entre un 3% y un 5% de variables de anticuerpos UDB (como un porcentaje del total de especies en el líquido fuente), las especies variables de anticuerpos UDB pueden reducirse al 0,3% y el 0,5% aproximadamente. En varias realizaciones, las especies variables UDB se reducen a: menos del 1%, menos del 0,8%, menos del 0,5%, menos del 0,3%, menos del 0,2% y/o menos del 0,1%. Preferentemente, en la purificación de un líquido fuente para la preparación de una proteína, las variables UDB se reducen a: menos del 1%, menos del 0,8%, menos del 0,5%, menos del 0,3%, menos del 0,2% y/o menos del 0,1% como un porcentaje del total de especies en el líquido fuente.

Proteínas para su utilización en los métodos de purificación de la invención

[0090] El anticuerpo con una región Fc para ser purificada según la invención según se describe aquí se prepara utilizando técnicas que se hallan bien establecidas en su campo y que incluyen, por ejemplo, técnicas sintéticas (como técnicas de recombinación y síntesis de péptidos o una combinación de ambas), o puede aislarse a partir de una fuente endógena de una proteína. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, una preparación de anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. Las técnicas para la producción de un polipéptido de enlace a antígenos, y en particular, anticuerpos, se describen a continuación. De forma alternativa, el anticuerpo con una región Fc puede ser una forma modificada de un anticuerpo, como un anticuerpo biespecífico, un conjugado de anticuerpo o una proteína de fusión de anticuerpos (p.ej., una proteína de fusión Fc). A continuación se describen también las técnicas de la producción de esas formas modificadas de anticuerpos y de las proteínas de fusión de anticuerpos.

Anticuerpos policlonales

[0091] Los anticuerpos policlonales se pueden preparar mediante la inmunización de un sujeto adecuado con un inmunógeno. El título del anticuerpo en el sujeto inmunizado puede controlarse a lo largo del tiempo mediante técnicas estándar, como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), utilizando un antígeno objetivo inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpos dirigidas contra el antígeno objetivo pueden aislarse del mamífero (por ejemplo, a partir de la sangre) y purificarse mediante técnicas bien conocidas, como la cromatografía con Sefarosa-Proteína A para obtener el anticuerpo, por ejemplo, IgG, fracción. En un tiempo adecuado tras la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpo anti-antígenos son mayores, las células que producen anticuerpos pueden obtenerse del sujeto y utilizarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, como la técnica hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) (véase también, Brown et al. (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh et al. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 2927-31; y Yeh et al. (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75). Para la preparación de anticuerpos policlonales quiméricos, véase Buechler et al. Patente de Estados Unidos núm. 6.420.113.

Anticuerpos monoclonales

[0092] Cualquiera de los bien conocidos protocolos utilizados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas pueden aplicarse a efectos de generar un anticuerpo monoclonal (véase, por ejemplo, G. Galfre et al. (1977) *Nature* 266:55052; Gefter et al. *Somatic Cell Genet.*, citado *supra*; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, citado *supra*; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, citado *supra*). Además, el trabajador extraordinariamente hábil apreciará que existen muchas variantes de esos métodos que también podrían ser útiles. Por lo general, la línea celular inmortalizada (por ejemplo, una línea celular de mieloma) es derivada de las mismas especies de mamíferos que los linfocitos. Por ejemplo, se pueden hacer hibridomas murinos mediante la fusión de linfocitos a partir de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la presente invención con una línea celular de ratón. Las líneas celulares inmortales preferidas son las líneas celulares de mieloma de ratón, que son sensibles al medio de cultivo con hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT") Cualquier número de líneas celulares de mieloma pueden utilizarse como parejas de fusión según las técnicas estándar, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de mieloma están disponibles gracias a ATCC. Por lo general, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan con esplenocitos de ratón utilizando glicol polietileno ("PEG"). Las células de hibridoma que resultan de la fusión se seleccionan utilizando un medio HAT, que mata las células de mieloma no fusionadas o fusionadas de forma improductiva (los esplenocitos no fusionados mueren después de varios días debido a que no son transformados). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención se detectan mediante el monitoreo de supernatants de cultivo del hibridoma para anticuerpos que ligan un antígeno objetivo utilizando un ensayo ELISA estándar.

Anticuerpos recombinants

[0093] Como alternativa a preparar hibridomas monoclonales que secretan anticuerpos, un anticuerpo monoclonal puede identificarse y aislarse mediante el monitoreo de una biblioteca de inmunoglobulina combinatorial recombinante (por ejemplo, una biblioteca de expresión en fago de anticuerpos) con un antígeno objetivo para aislar los miembros de la biblioteca de inmunoglobulina que ligan el antígeno objetivo. En el Mercado hay disponibles kits para generar y monitorizar bibliotecas de expresión en fago (por ejemplo, el Sistema de Anticuerpos en fago recombinante de Pharmacia, Catálogo núm. 27-9400-01; y el Kit de expresión en fago de Stratagene SurfZAP™, Catálogo núm. 240612). Además, algunos ejemplos de métodos y reagentes particularmente flexibles para su uso en la creación y monitorización de una biblioteca de expresión se pueden hallar también, por ejemplo, en Ladner et al., Patente de Estados Unidos núm. 5.223.409; Kang et al. Publicación Internacional PCT Núm. WO 92/18619; Dower et al. Publicación Internacional PCT Núm. WO 91/17271; Winter et al. Publicación Internacional PCT WO 92/20791; Markland et al. Publicación Internacional PCT Núm. WO 92/15679; Breitling et al. Publicación Internacional PCT WO 93/01288; McCafferty et al. Publicación Internacional PCT Núm. WO 92/01047; Garrard et al. Publicación Internacional PCT Núm. WO 92/09690; Ladner et al. Publicación Internacional PCT Núm. WO 90/02809; Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896;

Clarkson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc. Acid Res. 19:4133-4137; Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982; y McCafferty et al. Nature (1990) 348:552-554.

5 Anticuerpos quiméricos y humanizados

[0094] Además, los anticuerpos recombinants, como los anticuerpos monoclonales humanizados y quiméricos, que constan tanto de porciones humanas como no humanas, pueden hacerse utilizando técnicas estándar de ADN recombinante, que se hallan dentro del alcance de la invención.

10 **[0095]** El término "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" hace referencia a una inmunoglobulina o anticuerpo que incluye al menos una cadena de inmunoglobulina humanizada o cadena de anticuerpos (p.ej., al menos una cadena humanizada ligera o pesada). El término "cadena de inmunoglobulina humanizada" o "cadena de anticuerpos humanizada" (p.ej., "cadena ligera de inmoglobulina humanizada" o "cadena pesada de inmunoglobulina humanizada") hace referencia a una cadena de inmunoglobulina o de anticuerpos (p.ej., una
15 cadena ligera o pesada, respectivamente) con una región variable que incluye una región variable básicamente a partir de una inmunoglobulina humana o anticuerpos y regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) (por ejemplo, al menos una región constante o porción de ella, en el caso de una cadena ligera y tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). El término "región variable humanizada" (por ejemplo, "región variable de cadena ligera humanizada" o "región variable de cadena pesada humanizada") hace referencia a una
20 región variable que incluye una región framework básicamente a partir de una inmunoglobulina o anticuerpos humanos y regiones determinantes de complementaridad (CDRs) básicamente a partir de una inmunoglobulina o anticuerpos no humanos.

25 **[0096]** La frase "básicamente a partir de una inmunoglobulina o anticuerpo humano" o "básicamente humano" se refiere a que, cuando se alinea con una inmunoglobulina o anticuerpo aminosecuencia humana a efectos de comparación, la región comparte al menos el 80-90%, 90-95%, o el 95-99% de identidad (p.ej., identidad de secuencia local) con la variable humana o 30 secuencias de región constante, permitiendo, por ejemplo, sustituciones conservadoras, sustituciones de secuencias consenso, sustituciones de línea germinal, retromutaciones, etc. La introducción de sustituciones conservadoras, sustituciones de secuencias consenso,
30 sustituciones de línea germinal, retromutaciones, etc. suelen denominarse "optimización" de un anticuerpo o cadena humanizada. La frase "básicamente a partir de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano" o "básicamente no humano" hace referencia a tener una secuencia de una inmunoglobulina o anticuerpo con al menos el 80-95%, preferiblemente al menos el 90-95%, y más preferiblemente el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntico al de un organismo no humano, por ejemplo, un mamífero no humano.

35 **[0097]** En consecuencia, todas las regiones o residuos de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado, o de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo, excepto las CDRs, son básicamente idénticas a las regiones o residuos correspondientes de una o más secuencia de inmunoglobulina humana nativa. El término "región correspondiente" o "residuo correspondiente" hace referencia a una región o residuo en una segunda secuencia de aminoácidos o
40 nucleótidos que ocupa la misma (p.ej., equivalente) posición que la región o residuo en su primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos, cuando la primera y segunda secuencia se alinean de forma óptima a efectos de comparación.

45 **[0098]** El término "identidad significativa" significa que las dos secuencias de polipéptidos, cuando se alinean de forma óptima, como mediante los programas GAP o BESTFIT que utilizan pesos del hueco por defecto, comparten al menos un 50-60% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos un 60-70% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos el 70-80% de identidad de secuencia, y más preferiblemente al menos el 80-90%, incluso más preferiblemente al menos el 90-95% de identidad de secuencia, e incluso más preferiblemente al menos el 95% de identidad de secuencia o más (por ejemplo, el 99% de la identidad de secuencia o más). El término "identidad sustancial" significa que dos secuencias de polipéptidos, cuando se alinean de forma óptima, como mediante los programas GAP o BESTFIT utilizando pesos de hueco por defecto, comparten al menos el 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos el 90-95% de identidad de secuencia, y más preferiblemente al menos el 95% de la identidad de secuencia o más (por ejemplo, el 99% de identidad de secuencia o más). Para una comparación de secuencia, por lo general, una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las
50 secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de referencia y de prueba se introducen en un ordenador, se diseñan las coordenadas de subsecuencia, si son necesarias, y se diseñan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba relativas a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa diseñados.

60 **[0099]** Se puede llevar a cabo una óptima alineación de secuencias a efectos de comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, ADv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante la búsqueda del método de semejanza de Pearson & Lipman, PRoc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante las realizaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el pack de software de genética de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr. Madison, Wisconsin, EE.UU.) o mediante
65

inspección visual (véase generalmente Ausubel et al., Protocolos actuales en biología molecular). Un ejemplo de algoritmo adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la semejanza de secuencia es el algoritmo BLAST, descrito en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990). El software para realizar los análisis BLAST se encuentra disponible al público a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (accesible públicamente a través del servidor de internet de los Institutos Nacionales de Salud NCBI). Por lo general, los parámetros de programa por defecto pueden utilizarse para llevar a cabo la comparación de secuencias, aunque también se utilizan los parámetros personalizados. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra (*W*) de 3, una expectativa (*E*) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

[0100] Por lo general, las posiciones de residuo que no son idénticas difieren de las sustituciones de aminoácidos conservadoras. A efectos de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservadoras o no conservadoras, los aminoácidos se clasifican del siguiente modo: Grupo I (cadenas laterales hidrofóbicas): leu, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrofílicas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas); Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservadoras implican sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Las sustituciones no conservadoras constituyen intercambiar un miembro de una de esas clases con un miembro de otra.

[0101] Por lo general, las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados ligan antígenos con una afinidad que se encuentra dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de ese anticuerpo no humanizado correspondiente. Por ejemplo, si el anticuerpo no humanizado tiene una afinidad de enlace de 10^{-9} M, los anticuerpos humanizados tendrán una afinidad de enlace de al menos 3×10^{-9} M, 4×10^{-9} M, 5×10^{-9} M o 10^{-9} M. Se dice que una cadena de inmunoglobulina "enlace de antígeno directo" cuando confiere a una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o su fragmento de enlace de antígeno) una propiedad de enlace específica o afinidad de enlace. Se dice que una mutación (por ejemplo, una retromutación) afecta sustancialmente la capacidad de una cadena pesada o ligera de enlazar con antígenos directos si afecta (por ejemplo, disminuye) la afinidad de enlace de una inmunoglobulina o anticuerpo (o su fragmento de enlace de antígeno) intacto, que consta de esa cadena mediante al menos un orden de magnitud comparado con el del anticuerpo (o su fragmento de enlace de antígeno) que consta de una cadena equivalente sin esa mutación. Una mutación "no afecta sustancialmente" (por ejemplo, disminuye) la capacidad de una cadena de enlace de antígeno directo" si afecta (por ejemplo, disminuye) la afinidad de enlace de una inmunoglobulina o anticuerpo (o su fragmento de enlace de antígeno) intacto, que consta de esa cadena mediante solo un factor de dos, tres o cuatro de los del anticuerpo (o su fragmento de enlace de antígeno), que consta de una cadena equivalente sin esa mutación.

[0102] El término "inmunoglobulina o anticuerpo quimérico" hace referencia a una inmunoglobulina o anticuerpo cuyas regiones variables derivan de una primera especie y cuyas regiones constantes derivan de una segunda especie. Las inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos pueden construirse, por ejemplo, mediante ingeniería genética, a partir de segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenezcan a especies distintas. Los términos "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" no pretenden englobar las inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, según se define más abajo. Aunque las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados son quiméricos en su construcción (p.ej., constan de regiones de más de una especie de proteína), incluyen características adicionales (p. ej., regiones variables con residuos CDR donantes y residuos variables receptores) no hallados en las inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, según se definen aquí.

[0103] Esos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir mediante técnicas de recombinación de AND bien conocidas, por ejemplo, utilizando métodos descritos en Robinson *et al.* Solicitud Internacional Núm. PCT/LTS86/02269; Akira, *et al.* Solicitud de patente europea 184,187; Taniguchi, M., Solicitud de patente europea 171,496; Morrison *et al.* Solicitud de patente europea 173,494; Neuberger *et al.* Publicación internacional PCT núm. WO 86/01533; Cabilly *et al.* Patente de Estados Unidos núm. 4,816,567; Cabilly *et al.* Solicitud de patente europea 125,023; Better *et al.* (1988) Science 240: 1041-1043; Liu *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) Canc. Res. 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) Nature 314:446-449; and Shaw *et al.* (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) BioTechniques 4:214; Winter Patente de Estados Unidos 5,225,539; Jones *et al.* (1986) Nature 321: 552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) Science 239:1534; y Beidler *et al.* (1988) J. Immunol. 141:4053-4060.

Anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos y expresión en fago

[0104] De forma alternativa, ahora resulta posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden, después de su inmunización, producen un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación de homocigotos de la región del gen de enlace de la cadena pesada de anticuerpos (J_H) en ratones mutantes de línea germinal y quimérica da lugar a una completa inhibición en la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de selección del gen de la inmunoglobulina en línea germinal humana en esos ratones mutantes en línea germinal da lugar a la producción de anticuerpos humanos después del desafío antigénico. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 6150584, 6114598 y 5770429.

[0105] También se pueden derivar anticuerpos completamente humanos a partir de bibliotecas de expresión en fago (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)). Los anticuerpos policlonales quiméricos también pueden obtenerse a partir de las bibliotecas de expresión en fago (Buechler et al. Patente de Estados Unidos núm. 6420113).

5

Anticuerpos biespecíficos y conjugados de anticuerpos

[0106] Los anticuerpos biespecíficos (BsAbs) son anticuerpos que tienen especificidades de enlace para al menos dos epítopes. Esos anticuerpos pueden derivarse a partir de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab)²). Los métodos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la material. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades distintas (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (quadromas) producen una mezcla potencial de distintas moléculas de anticuerpos (véase WO 93/08829 y en Tranuecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)).

10

15

[0107] Los anticuerpos biespecíficos también incluyen anticuerpos entrecruzados o “heteroconjugados” Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede emparejarse con avidina, el otro con biotina u otra carga útil. Los anticuerpos heteroconjugados pueden fabricarse utilizando cualquier método entrecruzado conveniente. Los agentes entrecruzados adecuados son bien conocidos en la material y se revelan en la Patente de Estados Unidos núm. 4676980, junto con numerosas técnicas de entrecruzamiento.

20

[0108] En otra realización, el anticuerpo puede ser conjugado, bien químicamente o genéticamente, con una carga útil como puede ser un reactivo, porción perceptible o funcional, por ejemplo, una inmunotoxina para producir un conjugado de anticuerpo. Esas cargas útiles incluyen, por ejemplo, inmunotoxinas, quimioterapia y radioisotopos, que son bien conocidos en este campo.

25

Proteínas de fusión de anticuerpos

[0109] Una proteína con una región Fc según se utiliza en la invención puede ser una proteína de fusión que contiene al menos la porción Fc de un anticuerpo fusionado con una proteína de no-anticuerpo o polipéptido. Por ejemplo, la región Fc puede fusionarse con un ligando para un receptor, de tal modo que se crea una proteína de fusión soluble, siendo capaz de ligar el receptor con funciones relacionadas a Fc (como estabilidad sérica, enlace de receptor Fc, etc.). De forma alternativa, la región Fc puede fusionarse con un dominio extracelular de un receptor de tal modo que se cree una proteína de fusión soluble, siendo capaz de enlazar el ligando para el receptor (compitiendo con el receptor nativo) y que tiene funciones relacionadas con Fc. Un ejemplo no limitado de esa proteína de fusión Fc es la etanercept (Embrex®), que consta del dominio de enlace de ligando extracelular del receptor TNF α humano fusionado con la porción Fc de IgG 1 humana. Las proteínas de fusión de anticuerpos (también conocidas como proteínas de fusión Fc o proteínas de fusión Ig) pueden prepararse utilizando técnicas estándar de recombinación de AND que ya han sido descritas en la material, véase por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5116964, la patente de Estados Unidos 5225538, la patente de Estados Unidos núm. 5336603 y la patente de Estados Unidos núm. 5428130, todas de Capon et al.

30

35

40

Anticuerpos anti-IL-13

45

[0110] En una realización preferida, la proteína con una región Fc a ser purificada según la invención es un anticuerpo anti-IL-13. Un anticuerpo anti-IL-13 preferido también recibe aquí el nombre de “IMA”.

[0111] Los anticuerpos que pueden ligar, neutralizar y/o inhibir uno o más actividades asociadas con IL-13, en especial, la actividad de señalización de IL-13, son útiles para tratar enfermedades relacionadas con IL-13, como el asma alérgico, el asma no alérgico, así como patologías relacionadas con el asma, como la fibrosis, la eosinofilia y la producción de mucosidad.

50

[0112] Los agentes de enlace de IL-13 que son antagonistas de IL-13, incluyendo anticuerpos y sus fragmentos de enlace de antígeno que ligan IL-13, en particular, IL-13 humana, con alta afinidad y especificidad. Los anticuerpos y sus fragmentos de enlace de antígenos de la presente revelación también se denominan aquí “anticuerpos anti-IL-13” y “fragmentos anti-IL-13”, respectivamente. Por ejemplo, el anticuerpo IL-13 o su fragmento puede ligar con IL-13, p.ej., un complejo consistente en receptor de IL-13 (“IL-13Ra1”) y la cadena alfa receptor de interleucina-4 (“IL-4Ra”), o una subunidad de ellos (p.ej., IL-13Ra1 o IL-4Ra, de forma individual). De este modo, los anticuerpos y sus fragmentos descritos aquí pueden utilizarse para interferir con (p. ej., inhibir, bloquear o reducir) una interacción, p.ej., enlace entre IL-13 y un complejo receptor IL-13, o una subunidad de ellos, interfiriendo con la formación de un complejo de señalización funcional.

55

60

Otra región Fc preferida con contenido de proteínas

[0113] En otra realización preferida, la proteína con una región Fc a ser purificada según la invención es un anticuerpo anti-Ap. Los anticuerpos anti-Ap se describen en la publicación PCT núm. WO 202/46237 y la Publicación de Estados Unidos núm. 20050118651, ambas tituladas "Anticuerpos humanizados que reconocen péptido beta-amiloide". Los anticuerpos anti-Ap preferidos pueden denominarse también aquí "AAB" y "12A11".

[0114] Otra región Fc preferida con proteínas incluye anticuerpos que han sido aprobados para uso terapéutico en humanos. Esos anticuerpos incluyen anticuerpos que ligan con un antígeno de célula tumoral, anticuerpos que ligan con una citosina, anticuerpos que ligan con un receptor de citosinas y anticuerpos que ligan con una proteína de adhesión. En consecuencia, en varias realizaciones, una región Fc con proteínas puede ser un anticuerpo o proteínas de fusión Fc que ligan con un antígeno seleccionado del grupo que forman CD3 (p.ej., OKT3), CD52 (p.ej., alemtuzumab; Capath®), VEGF (p.ej., bevacizumab; Avastin®), EGFR (p.ej., cetuximab; Erbitux®), CD33 (p.ej., gemtuzumab; Mylotarg®), CD20 (p.ej., rituximab; Rituxan®; tositumab; Bexxar®; ibritumomab; Zevalin®), HER-2 (p.ej., trastuzumab; Herceptin®), TNFa (p.ej., adalimumab; Humira®, infliximab; Remicade®; etanercept; Embrel®), CD25 (p.ej., daclizumab; Zenapax®; basiliximab; Simulect®), RSV (p.ej., palivizumab; Synagis®), IgE (p.ej., omalizumab; Xolair®), gp IIb/IIIa (p.ej., abciximab; Reopro®), CD11a (p.ej., efalizumab; Raptiva®) y a4 integrina (p.ej., natalizumab; Tysabri®).

[0115] Se entiende que cualquiera de las moléculas polipeptídicas anteriores, solas o en combinación, son adecuadas para su preparación como región Fc con proteínas según la invención.

[0116] Varios aspectos y realizaciones de la presente invención se describen en detalle mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, pero de ninguna manera limitante.

[0117] Los siguientes ejemplos se ofrecen solo a efectos ilustrativos. Los ejemplos se ofrecen utilizando tres anticuerpos monoclonales diferentes (denominados AAB, 12A11 y IMA). Se describen ocho experimentos separados, donde cada uno representa una combinación de anticuerpo y eliminación de impurezas.

Materiales y métodos

[0118] En general, la práctica de la presente invención emplea, excepto si se indica de otro modo, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, p.ej., tecnología de inmunoglobulina), y técnicas estándar en electroforesis. Véase, p.ej., Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Clonación Molecular: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Protocolos de ingeniería de anticuerpos (Métodos de biología molecular)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Ingeniería de anticuerpos: un enfoque práctico (Practical Approach Series, 169)*, McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Anticuerpos: un manual de laboratorio*, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); *Protocolos actuales de biología molecular*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992). Bousse et al., Dimensionado de proteína en un microchip, *Anal. Chem.* 73, 1207-1212 (2001); Knapp et al., *Aplicaciones Lab-on-a-chip comercializadas y emergentes*; In: *Procedimientos del simposio mTAS de 2001*, Ramsey, J.M. & van den Berg, A., 7-10 (2001); y Mhatre et al., *Estrategias para ubicar enlaces de disulfuro en un anticuerpo monoclonal a partir de espectrometría de masa*, *Rapid Commun.Mass Spectrom*, 13 (24) 2503-2510 (1999).

Producción de proteína objetivo

[0119] El Fc con contenido de proteínas puede producirse mediante métodos de expresión estándar, p.ej., utilizando una línea celular de mamífero recombinante desarrollada en cultivo en suspensión. Los medios condicionados que contienen el Fc que contiene a su vez la proteína en cuestión se genera en un bioreactor de producción. El producto resultante puede cultivarse y clarificarse con una etapa de clarificación adecuada, como por ejemplo, microfiltración y filtración de 0,22mm o centrifugado, tampones de filtrado y filtración de 0,22mm.

Purificación de proteína objetivo

[0120] La purificación de los anticuerpos monoclonales objetivos aquí ejemplificados (AAB, 12A11 y IMA) consiste en la captura de la molécula objetivo en la cromatografía de afinidad de la proteína A. Esto puede consistir en de rmp Proteína A-Sepharose™ Fast Flow, Proteína A-Sepharose™ Fast Flow, o Proteína A MabSelect. La resina se lava según se describe en cada experimento y el producto eluido y testado para niveles de impureza.

Análisis de la proteína objetivo

[0121] Se utilizó la fase HPLC reversa (RP-HPLC) para cuantificar la cantidad de IRT presente en las muestras de anticuerpo monoclonales AAB, mientras que se empleó el método Pro A HPLC para determinar los niveles de IRT del anticuerpo monoclonal IMA. La cromatografía de exclusión de tamaño (SEC-HPLC) se utilizó para determinar el porcentaje de proteína monomérica (IgG monomérica), las especies de peso alto molecular (HMW), y de peso bajo molecular (LMW). El análisis de desnaturalización de SEC-HPLC se llevó a cabo para determinar la cantidad relativa de especies ligadas bajo disulfuro (UDB) en las muestras. Se determinaron los niveles de HCP en las muestras del test utilizando un ensayo con inmunoabsorbente vinculado a enzimas (ELISA).

Ensayos analíticos: IRT y UDB

Fase HPLC reversa (Análisis AAB IRT)

5 **[0122]** La RP-HPLC se llevó a cabo del siguiente modo. Se realizó una reducción de cada muestra mediante incubación a 40°C durante 60min en presencia de 2,5 mM DTT. Se llevó a cabo la alcalización mediante la incubación a temperatura de sala en presencia de 5,5 mM de ácido yodoacético. Tras la reducción y la alquilación, todas las muestras se enfriaron con 5ml de 1M DTT. El límite de cuantificación para este ensayo es el 0,5%. Se inyectaron unos 40mg de cada muestra reducida y alquilada a una columna POROS R1/H RP-HPLC funcionando durante 70 minutos bajo las siguientes condiciones:

15 Columna: Poros R1/H RP-HPLC Temp Columna: 50°C;
 Fase móvil A: 0,1% TFA (p/v) en agua;
 Fase móvil B: 0,1% TFA (p/v) en 95% de acetonitrilo;
 Índice de flujo: 1,0 mL/min
 Detección: 217 nm
 Tiempo de ejecución: 70 minutos
 Inyección: triplicado de 40mg cada uno

20 **[0123]** Los tiempos de gradiente fueron los que muestra la TABLA 1.

Tabla 1: Tiempos de gradiente para el método RP-HPLC

Tiempo de gradiente	% A	% B
0-1	95	5
2	70	30
54	60	40
55.1-70	95	5

35 Proteína A HPLC (Análisis IMA IRT)

40 **[0124]** La Proteína A-HLPC se llevó a cabo del siguiente modo. Se llevó a cabo un total de 100mg por inyección en una columna POROS Pro A a temperatura de sala durante 35 minutos bajo las siguientes condiciones:

45 Columna: Poros Pro A 4,6 x 50mm Temp Columna: ambiente;
 Fase móvil A: 50mM format de ammonio, pH 6,0;
 Fase móvil B: 10mM format de ammonio, 0,8% ácido fórmico;
 Índice de flujo: 2,0 mL/min
 Detección: 280 nm
 Tiempo de ejecución: 35 minutos
 Inyección: triplicado de 100mg cada uno

50 **[0125]** Los tiempos de gradiente son los que aparecen en la tabla 2.

Tabla 2: Tiempos de gradiente para la columna Pro A

Tiempos de gradiente	% A	% B
0-5	100	0
25-30	55	45
30.5-35	100	0

dSEC-HPLC (Análisis AAB UDB)

65 **[0126]** La desnaturalización de SEC-HPLC se realizó del siguiente modo. El pretratamiento de muestras para la desnaturalización del ensayo de SEC implica una mezcla reagente/muestra en concentraciones finales de

200mg/mL de proteína, 3M de Guanidina HCl, 100mM Tris, con un pH de 7,4. Las muestras se calentaron a 80°C durante 20 minutos mientras se mezclaban mediante inversión. Para este ensayo, se emplearon dos controles para permitir una asociación de los niveles de UDB. Se utilizaron las referencias internas con altos y bajos niveles de UDB como controles. Las condiciones cromatográficas/ de ensayo fueron las siguientes:

5
 10
 Columna: Tosoh Biosep G3000 SWx1 Temp. Columna: Ambiente
 Fase móvil: 3M Guanidina HCl, 25mM NaPO₄, pH 6,8
 Gradiente: isocrático
 Índice de flujo: 0,5 mL/min
 Detección: 280 nm
 Tiempo de ejecución: 50 minutos
 Inyección: Triplicado 50mL (10mg)

15 EJEMPLO 1: Comparación de amortiguadores de lavado para eliminación de IRT (AAB)

[0127] En este ejemplo, una solución impura con el anticuerpo monoclonal AAB se purificó mediante absorción hacia una columna de Proteína A seguido de un primer lavado con un búfer de lavado bien con CaCl₂, NaCl o glicol propileno.

20 [0128] El cultivo con el anticuerpo monoclonal se purificó a pequeña escala utilizando una columna rmp Proteína A Sepharose™ (8,9mL) conectada a un sistema de cromatografía AKTA FPLC de GE Healthcare. Se emplearon las siguientes condiciones en todas las etapas de cromatografía rmp Proteína A Sepharose™ FF (las excepciones están anotadas en las descripciones experimentales individuales).

25 Dimensiones de columna – 1,0cmx11,4cm. Índice de flujo operativo – 150cm/hr
 Equilibrio 1-20mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Descarga – 20mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5 (1 volumen de columna)
 Lavado 1 – Variable (Véase Tabla 3) excepto para la ejecución 1, que no tenía lavado 1
 Lavado 2 – 20mM Tris, 1,0M NaCl, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 30 Lavado 3 – 10 mM Tris, 75 mM NaCl, pH 7,5 (7 volúmenes de columna)
 Elución – 50 mM glicina, 75mM NaCl, pH 3,1 (6 volúmenes de columna)
 Extracción 1 – 20 mM citrato de sodio, pH 2,7 (5 volúmenes de columna)
 Extracción 2 – 6M guanidina HCl (2 volúmenes de columna)
 Extracción de lavado – 20mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 35 Almacenamiento – 16% etanol (5 volúmenes de columna)
 Temperatura de ejecución: 2-8°C

40 [0129] Los ensayos de la columna rmp Proteína A Sepharose™ se equilibraron con 5 volúmenes de columna de 20mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5. La columna se cargó en una resina de aproximadamente 10mg de producto/mL. La carga fue seguida de una descarga de 1 volumen de columna con búfer de equilibrio y 5 volúmenes de columna de la solución del lavado 1. Todas las soluciones del lavado 1 testadas se resaltan en la Tabla 3. El lavado 1 fue incluido en todos los ensayos excepto en el 1. El lavado 1 fue seguido de 5 volúmenes de columna de 20mM Tris, 1,0M NaCl, pH 7,5 y 7 volúmenes de columna de 10mM Tris, 75 mM NaCl, pH 7,5. El anticuerpo monoclonal fue eluido de la columna con 50mM glicina, 75mM NaCl, pH 3,1. El conjunto del producto se neutralizó a 7,9-8,1 con M Tris pH 8,5. Las columnas fueron extraídas, lavadas y almacenadas. La tabla 3 muestra los niveles de especies IRT y LMW presentes en los conjuntos de producto de los diversos ensayos.

Tabla 3. Valores IRT y LMW para varios búferes del lavado 1

50

Ejecucion #	Condición	% LMW	% IRT
1	Control (No lavado 1)	4.4	2.5
2	20% Propileno Gricol, pH 7.5	4.7	2.5
3	50 mM Tris,2.0M Cloruro de Magnesio, pH7.5	1.6	1
4	50 mM Tris,2.5M Cloruro de Magnesio, pH7.5	1.5	1.3
5	50 mM Acetato,2.0MCloruro de Magnesio, pH4.5	0,9	0,8
5	50 mM Tris,4.0M Cloruro Sódico, pH7.5	4.4	2.5
7	50 mM Tris,2.0M Cloruro Cálxico, pH7.5	1.8	1.4
8	50 mM Tris,2.5M Cloruro Cálxico, pH7.5	0,8	0,8

60

[0130] Los resultados arrojaron que los lavados de cloruro de magnesio y el cloruro de calcio redujeron los niveles de especies de IRT y LMW, mientras que los lavados de cloruro de sodio y glicol propileno no redujeron las especies IRT o LMW.

5 EJEMPLO 2: Cromatografía de Proteína A con lavado CaCl₂ para eliminación de IRT

[0131] En este ejemplo, se llevó a cabo una purificación de anticuerpo a mayor escala utilizando una cromatografía de Proteína A con lavado de CaCl₂ para eliminar especies IRT.

10 **[0132]** Se purificó el anticuerpo monoclonal a escala piloto utilizando una columna de Proteína A Mabselect (2 ,4L) conectada a un sistema de cromatografía Millipore K-Prime 400. Los dos ensayos de MabSelect se llevaron a cabo según se describe a continuación.

15 Dimensiones de columna – 13cmx18cm. Índice de flujo operativo – 150cm/hr (5 volúmenes de columna)
 Equilibrio 1-20 mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Descarga – 20mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 (2 volúmenes de columna)
 Lavado 1 – 50mM Tris, 2 M CaCl₂, pH 7,5 para la práctica 1 y sin lavado 1 para la práctica 2
 Lavado 2 – 20mM Tris, 1,0M NaCl, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Lavado 3 – 10 mM Tris, 75 mM NaCl, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 20 Elución – 50 mM glicina, 25mM NaCl, pH 3,1 (6 volúmenes de columna)
 Extracción 1 – 50 mM glicina, 0,5M NaCl, pH 2,7 (5 volúmenes de columna)
 Extracción 2 – 6M guanidina HCl (2 volúmenes de columna)
 Extracción de lavado – 20mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Almacenamiento – 16% etanol (5 volúmenes de columna)
 25 Temperatura de ejecución: 2-8°C

[0133] La columna de Proteína A MabSelect se equilibró con 5 volúmenes de columna de 20mM Tris, 150mM NaCl, pH7.5 Las columnas se cargaron en una resina de aproximadamente 10mg de producto/mL. Tras ello, se continuó con una descarga de 2 volúmenes de columna con búfer de equilibrio y 5 volúmenes de columna de la solución del lavado 1. Esta solución de lavado 1 consiste en 50mM Tris, 2.0M CaCl₂, pH 7,5 para la práctica 1, mientras que se dejó completamente para la práctica 2. Al lavado 1 le siguieron 5 volúmenes de columna 50mM Tris, 1,0 M NaCl, pH 7,5 y 5 volúmenes de columna de 10mM Tris, 75 mM NaCl, pH 7,5. El anticuerpo monoclonal se eluyó a partir de la columna de Proteína A Mabselect con 50mM glicina, 25mM NaCl, pH 3,1. El conjunto del producto se neutralizó hasta 7,8-8,2 con 2 M Tris pH 8,5. Las columnas fueron extraídas, lavadas y almacenadas. Los resultados son los que muestra la Tabla 4.

Tabla 4: % de niveles de IRT en ensayos a escala piloto con y sin lavado de cloruro de calcio

Ejecucion #	Lavado 1 Buffer	% IRT
1	50mM Tris, 2 M Cacl ₂ , pH 7.5	0.8
2	Control (Ninguno)	1.9

40 **[0134]** Los resultados mostraron que, a escala piloto, el lavado de cloruro de calcio eliminó el IRT del conjunto del producto.

45 EJEMPLO 3: Eliminación de IRT (IMA)

[0135] En este ejemplo, se utilizó un anticuerpo monoclonal distinto (IMA) al utilizado en el Ejemplo 1 en una purificación a pequeña escala con lavado de CaCl₂.

50 **[0136]** El cultivo con el anticuerpo monoclonal distinto (IMA) se purificó a pequeña escala utilizando una columna de Proteína A MabSelect (17,3mL) conectada a un sistema de cromatografía AKTA Explorer de GE Healthcare. El ensayo se llevó a cabo del siguiente modo.

55 Dimensiones de columna – 1,1cmx18,2cm (17,3 mL)
 Índice de flujo operativo – 300 cm/hr
 Equilibrio 1-20 mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5 (5,1 volúmenes de columna)
 Lavado 1 – 20mM Tris, 1 M CaCl₂, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Lavado 2 – 50mM Tris, 0,6M CaCl₂, pH 5,0 (5 volúmenes de columna)
 Lavado 3 – 50 mM Tris, 5 mM NaCl, pH 7,5 (3 volúmenes de columna)
 60 Lavado 4 – 10 mM Tris, 5 mM NaCl, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)

Elución – 50 mM glicina, 5mM NaCl, pH 3,0 (5 volúmenes de columna)
 Extracción – 50 mM glicina, 0,5M NaCl, pH 2,7 (5 volúmenes de columna)
 Extracción 2 – 6M guanidina HCl (5 volúmenes de columna)
 Extracción de lavado – 20mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 (6 volúmenes de columna)
 Almacenamiento – 16% etanol (5 volúmenes de columna)
 Temperatura de ejecución: 18-24°C

[0137] La columna de proteína A MabSelect se equilibró con 5 volúmenes de columna de 20 MM Tris, 1 M NaCl, pH 7,5. Se cargó la columna en aproximadamente resina de 45mg de producto/L. La columna se lavó del siguiente modo: 5 volúmenes de columna de 20mM Tris, 1,0 M NaCl, pH 7,5, 5 volúmenes de columna de 50mM de acetato de sodio, 0,6M CaCl₂, pH 5,0, 3 volúmenes de columna de 50mM Tris, 5mM NaCl, pH 7,5, y 5 volúmenes de columna de 10 mM Tris, 5 mM NaCl, pH 7,5. El producto se eluyó a partir de la columna de proteína A MabSelect con 50 mM de glicina, 5mM NaCl, pH 3,0. El conjunto del producto se neutralizó a 7,7 con 2 M Tris pH 8,0. La columna fue extraída, lavada y almacenada. Los resultados aparecen en la Tabla 5, que ofrece los niveles de especies de IRT en la carga y picos.

Tabla 5: % de IRT en la carga y picos en la práctica con lavado de CaCl₂

% IRT en Carga	% IRT en Pico
5,8	1.1

[0138] Los resultados mostraron que el lavado con 0,6M CaCl₂ ofreció una reducción de 5 veces del IRT.

EJEMPLO 4: Eliminación de proteína de célula huésped (IMA)

[0139] En este ejemplo se examinó la capacidad del lavado de CaCl₂ para eliminar la proteína de célula huésped (HCP) a partir de una preparación con el anticuerpo monoclonal IMA.

[0140] Se purificó el cultivo con el anticuerpo monoclonal a pequeña escala utilizando una columna de Proteína A MabSelect (19mL) conectada a un sistema de cromatografía AKTA FPLC de GE Healthcare. Los dos ensayos con MabSelect se desarrollaron del siguiente modo:

Dimensiones de columna – 1,1cmx20,0cm (19 mL)
 Índice de flujo operativo – 300 cm/hr
 Equilibrio 1-20 mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5 (5,0 volúmenes de columna)
 Lavado 1 – 20mM Tris, 1 M NaCl, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Lavado 2 – 50mM de acetato de sodio, 0,6M CaCl₂, pH 5,0 (5 volúmenes de columna, sólo para la práctica 2)
 Lavado 3 – 50 mM Tris, 5 mM NaCl, pH 7,5 (2 volúmenes de columna)
 Lavado 4 – 10 mM Tris, 5 mM NaCl, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Elución – 50 mM glicina, 5mM NaCl, pH 3,0 (5 volúmenes de columna)
 Extracción – 6 M guanidina HCl (5 volúmenes de columna)
 Extracción de lavado – 20mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 (6 volúmenes de columna)
 Almacenamiento – 16% etanol (5 volúmenes de columna)
 Temperatura de ejecución: 18-24°C

[0141] La columna de proteína A MabSelect se equilibró con 5 volúmenes de columna de 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5. La columna se cargó en resina de aproximadamente 45mg de producto/mL. Se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de 20 mM Tris, 1,0 M NaCl, pH 7,5; en la práctica 2 se realizó un lavado adicional con 5 volúmenes de columna de 50mM de acetato de sodio, 0,6M CaCl₂, pH 5,0. Antes de la elución, se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de 50 mM Tris, 5mM NaCl, pH 7,5 y 5 volúmenes de columna de 10 mM Tris, 5 mM NaCl, pH 7,5. El producto se eluyó a partir de la columna de proteína A MabSelect con 50 mM de glicina, 5mM NaCl, pH 3,0. El conjunto del producto se neutralizó a un pH de 7,7 con 2 M Tris, pH 8,0. La columna fue extraída, lavada y almacenada. Los resultados aparecen en la Tabla 6, que ofrece el nivel de especies HCP presentes en la práctica de control y la práctica lavada con CaCl₂.

Tabla 6: eliminación de HCP con y sin lavado de CaCl₂

Ejecución #	Lavado 2 Condición	HCP (PPM)
1	Ninguno (Control)	6,124
2	50 mM Acetato Sódico, 0.6 CaCl ₂ , pH 5.0	2.295

[0142] Los resultados mostraron que el lavado de CaCl₂ ofreció una eliminación tres veces mayor de HCP en comparación con la práctica de control.

EJEMPLO 5: Eliminación de ADN (AAB)

[0143] En este ejemplo se examinó la capacidad del lavado de CaCl₂ para eliminar el ADN de célula huésped a partir de una preparación con el anticuerpo monoclonal AAB.

[0144] El cultivo con el anticuerpo monoclonal se purificó a pequeña escala utilizando una columna de Proteína A MabSelect (19mL) conectada a un sistema de cromatografía AKTA FPLC de GE Healthcare. Los tres ensayos con MabSelect se llevaron a cabo según se describe a continuación.

Dimensiones de columna – 1,1cmx20,0cm (19 mL)

Índice de flujo operativo – 300 cm/hr

Descarga - 20 mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5 (2 volúmenes de columna)

Lavado 1 – 50mM Tris, 1 M CaCl₂, pH 7,5 (5 volúmenes de columna) (sólo en los ensayos 2 y 3)

Lavado 2 – 20mM Tris, 1M NaCl, pH 7,5 (5 volúmenes de columna) (sólo en los ensayos 1 y 3)

Lavado 3 – 10 mM Tris, 75 mM NaCl, pH 7,5 (7 volúmenes de columna)

Elución – 50 mM glicina, 75mM NaCl, pH 3,0 (6 volúmenes de columna)

Extracción – 50 mM de glicina, 0,5M NaCl, pH 2,7 (5 volúmenes de columna)

Extracción de lavado – 20mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)

Almacenamiento – 16% etanol (5 volúmenes de columna)

Temperatura de ejecución: 18-24°C

[0145] Los ensayos con la columna de proteína A MabSelect se equilibraron con 5 volúmenes de columna de 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5. Las columnas se cargaron en resina de aproximadamente 40mg de producto/mL. Tras ello, se realizó una descarga de 2 volúmenes de columna con búfer de equilibrio. En los ensayos 2 y 3, esta etapa continuó con 5 volúmenes de columna de la solución del lavado 1. En los ensayos 1 y 3 se emplearon 5 volúmenes de columna de la solución del lavado 2. Los tres ensayos utilizaron los 7 volúmenes de columna de la solución del lavado 3. El anticuerpo monoclonal se eluyó de la columna de Proteína A MabSelect con 50 mM de glicina, 75mM NaCl, pH 3,0. El conjunto del producto se neutralizó a un pH de 7,5-8,0 con 2 M Tris, pH 8,5. Las columnas fueron extraídas, lavadas y almacenadas. Los resultados aparecen en la Tabla 7.

Tabla 7: eliminación de ADN con lavado de cloruro de calcio

Ejecución #	Lavado 1	Lavado 2	DNA(ng/mL)	DNA (ppm)
1	Ninguno (Control)	20mM Tris, 1M NaCl, pH 7.5	3.6	0.37
2	50mM Tris, 2M CaCl ₂ , pH 7.5	Ninguno	0.9	0.09
3	50mM Tris, 2M CaCl ₂ , pH 7.5	20mM Tris, 1M NaCl, pH 7.5	0.3	0.03

[0146] Los resultados mostraron que la adición de 50mM Tris, 2,0 de cloruro de calcio, pH 7,5 ofreció una reducción de ADN 10 veces superior en comparación con la utilización de la solución de lavado de NaCl.

EJEMPLO 6: Eliminación (12A11) de proteína de célula huésped (HCP)

[0147] En este ejemplo se utilizó un tercer anticuerpo monoclonal, 12A11, en ensayos de purificación en los que se testaron varias condiciones de lavado para la capacidad de eliminar HCP.

[0148] Se llevó a cabo un formato de cribado de alto rendimiento (HTS) en una placa de filtrado de 96 pozos para identificar las mejores condiciones de lavado para la eliminación de impurezas como HCP para la etapa de MabSelect. Este cribado varió los excipientes de lavado, la concentración de excipientes y el pH para determinar su efecto sobre el proceso relacionado con impurezas como la HCP.

[0149] La resina MabSelect se equilibró utilizando 5 mM Tris, 10 mM NaCl, pH 7,3 y se cargó con producto en una columna. La resina se sacó y se mezcló, y se distribuyeron 50mL de resina a cada pozo de la placa de filtrado. La resina en cada pozo se equilibró en una solución de 5 mM Tris, 10 mM NaCl, pH 7,3 y se lavó con cada uno de las soluciones de lavado de excipientes en 3 etapas, donde se emplearon 300mL de búfer de lavado en cada una. Después del lavado de excipientes, se llevó a cabo un segundo lavado con un búfer de 5mM Tris, 10mM NaCl, pH 7,3 en cuatro etapas de 300mL cada una. El producto se eluyó a partir de la resina en 3 etapas de 300mL cada una. Las etapas de elución 1 y 2 se combinaron y testaron para comprobar los niveles de HCP.

Volumen de resina – 50mL

Excipientes de lavado – cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, concentraciones de excipientes – 100, 250, 500, 1000, 1500 y 2000 mM pH del Excipiente – 6,0 y 7,5

Búfers de elución – 25 mM Hepes, 10 mM NaCl, pH 3,0, 25 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 3,0, 50mM glicina, 10mM NaCl, pH 3,0, 50 mM de glicina, 100 mM NaCl, pH 3,0 y 100mM de arginina, 100 mM NaCl, pH 3,0

Temperatura del ensayo: 18-24°C

[0150] Los resultados se muestran en las tablas 8 y 9.

10 Tabla 8: valores de HCP para resina MabSelect lavada con cloruro de sodio, cloruro de calcio o cloruro de magnesio con un pH de 6,0

Buffer de elución	Elución. Concentración de NaCl (mM)	Concentración Excipiente de lavado (mM)	Excipiente de lavado		
			NaCl	CaCl ₂	MgCl ₂
			HCP (ppm)		
50 mM Glicina	10	100	46,800	28,500	30,800
25 mM HEPES		250	35,300	17,900	22,000
100 mM Arginina		500	40,900	17,700	18,400
50 mM Glicina		1000	34,300	12,600	14,200
25 mM HEPES		1500	27,000	7,800	10,700
100 mM Arginina		2000	43,900	5,800	9,300

30 Tabla 9: valores de HCP para resina MabSelect lavada con cloruro de sodio, cloruro de calcio o cloruro de magnesio con un pH de 7,5

Buffer de elución	Elución. Concentración de NaCl (mM)	Concentración Excipiente de lavado (mM)	Excipiente de lavado		
			NaCl	CaCl ₂	MgCl ₂
			HCP (ppm)		
50 mM Glicina	100	100	27,900	17,900	21,800
25 mM HEPES		250	24,700	16,600	18,200
100 mM Arginina		500	26,500	14,000	17,300
50 mM Glicina		1000	30,100	14,500	17,700
25 mM HEPES		1000	35,300	12,000	12,500
100 mM Arginina		2000	41,700	8,200	11,700

[0151] Los resultados mostraron que tanto el cloruro de calcio como el cloruro de magnesio redujeron el nivel de HCP en el conjunto máximo de MabSelect en comparación con el cloruro de sodio con un pH de 6,0 (Tabla 8) y de 7,5 (Tabla 9) en todas las concentraciones de excipientes.

EJEMPLO 7: eliminación de especies ligadas bajo disulfuro (UDB)

[0152] En este ejemplo se examinó la capacidad del lavado de CaCl₂ para eliminar las especies ligadas bajo disulfuro (UDB).

[0153] Se realizaron dos ensayos con rmp Proteína A Sepharose™ FF tal y como se describe en el ejemplo 1.

Dimensiones de columna – 1,0cmx11,4cm

Índice de flujo operativo – 150 cm/hr

Descarga - 20 mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5 (1 volumen de columna)

Lavado 1 – 50mM de acetato, 2,0 M CaCl₂, pH 5,0 para el ensayo 1, nada para el ensayo 2

Lavado 2 – 20mM Tris, 1M NaCl, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Lavado 3 – 10 mM Tris, 75 mM NaCl, pH 7,5 (7 volúmenes de columna)
 Elución – 50 mM glicina, 75mM NaCl, pH 3,1 (6 volúmenes de columna)
 Extracción 1 – 20 mM citrato de sodio, pH 2,7 (5 volúmenes de columna)
 5 Extracción 2 – 6 M guanadina HCl (2 volúmenes de columna)
 Extracción de lavado – 20mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Almacenamiento – 16% etanol (5 volúmenes de columna)
 Temperatura de ejecución: 2-8°C

10 **[0154]** Las columnas de rmp Proteína A Sepharose FF se equilibraron con 5 volúmenes de columna de 20mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5. Se cargaron las columnas en una resina de aproximadamente 10mg de producto/mL. Después se produjo una descarga de 1 volumen de columna con búfer de equilibrio y luego 5 volúmenes de columna de la solución del lavado 1. Esta solución del lavado 1 consistía en 50mM de acetato, 2,0 M CaCl₂, pH 5,0 para el
 15 ensayo 1, mientras que se descartó en el ensayo 2. El lavado 1 siguió con 5 volúmenes de columna de 20 mM Tris, 1,0 M NaCl, pH 7,5 y 7 volúmenes de columna de 10mM Tris, 75mM NaCl, pH 7,5. El anticuerpo monoclonal se eluyó de la columna de rmp Proteína A Sepharose™ FF con 50mM de glicina, 75mM NaCl, pH 3,1. El conjunto del producto se neutralizó a 7,8-8,2 con 2 M Tris pH 8,5. Las columnas fueron extraídas, lavadas y almacenadas. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

20 Tabla 10: % de UDB para muestras con y sin lavado de calcio

Ejecución #	Muestra	% UDB
25 1	50 mM Acetato, 2.0 M CaCl ₂ , pH 5.0	9.5
2 2	Ninguno (Control)	20.8

30 **[0155]** Se observó una reducción de 2 veces en los niveles de UDB para el ensayo que tuvo el lavado adicional de 50mM de acetato, 2,0 CaCl₂, pH 5,0.

35 EJEMPLO 8: Eliminación de HCP e IRT con otros lavados de sales catiónicas divalentes (AAB)

[0156] En este ejemplo se examinó la capacidad de los lavados con MnCl₂ o NiCl₂ para eliminar las impurezas de una preparación con el anticuerpo monoclonal AAB.

40 **[0157]** Se llevaron a cabo dos ensayos para evaluar el efecto de los lavados con otras sales catiónicas divalentes, como MnCl₂ y NiCl₂. También se llevaron a cabo 2 ensayos de control, uno con un lavado de 50mM Tris, 1,0 M NaCl, pH 7,5 (no se esperaba eliminación de IRT o HCP), y el otro con un lavado de 50mM Tris, 2,0 M CaCl₂, pH 7,5.

45 **[0158]** El cultivo con el anticuerpo monoclonal se purificó a pequeña escala utilizando una columna de Proteína A MabSelect (9mL) conectada a un sistema de cromatografía AKTA FPLC de GE Healthcare. Los ensayos MabSelect se llevaron a cabo según se describe a continuación. Tal y como se describe a continuación, todos los parámetros operativos fueron idénticos para los cuatro ensayos excepto para el lavado 1, que fue variable (Tabla 11).

50 Dimensiones de columna – 1,0cmx11,5cm (9 mL)
 Índice de flujo operativo – 300 cm/hr (Equilibrio, lavado 2, Elución, Regeneración, Almacenamiento)
 Índice de flujo operativo – 230 cm/hr (Carga, Descarga, lavado 1)
 Equilibrio 1 – 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 (5,0 volúmenes de columna)
 Lavado 1 – Variable (véase su composición en la Tabla 11)
 Lavado 2 – 50mM Tris, 10mM NaCl, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 55 Elución – 50 mM glicina, 10mM NaCl, pH 3,0 (3 volúmenes de columna)
 Regeneración – 50 mM NaOH, 0,5 M Na₂SO₄ (5 volúmenes de columna)
 Almacenamiento – 16% etanol, 40mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)
 Temperatura de ejecución: 18-24°C

60 **[0159]** La columna de proteína A MabSelect se equilibró con 5 volúmenes de columna de 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5. Se cargó la columna en una resina de aproximadamente 40mg de producto/mL. La carga restante se descargó de la columna con 5 volúmenes de columna de 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5. La columna se lavó con una de las soluciones descritas en la Tabla 11. Antes de la elución, se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de 50 mM Tris, 10 mM NaCl, pH 7.5. El producto se eluyó de la columna de proteína A MabSelect con 50 mM de glicina, 10mM NaCl, pH 3,0. El conjunto del producto se neutralizó en un pH de 8,0 con 2 M Tris, pH 9,0. La columna fue extraída con 5 volúmenes de columna de 50mM NaOH, 5 M Na₂SO₄, luego almacenada con 5 volúmenes de

columna con el 16% de etanol, 50mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5. Los resultados se muestran en la Tabla 11 (eliminación de HCP) y en la Tabla 12 (eliminación de IRT).

Tabla 11: eliminación de HCP con varias soluciones de lavado

Ejecución #	Lavado 1 Condición	HCP (PPM)
1	50 mM Tris, 1.0M NaCl, ph 7.5	17,600
2	50mM Acetato Sódico, 1.5 M MnCl ₂ , pH5.0*	10,600
3	50mM Acetato Sódico, 1.5 M NiCl ₂ , pH 5.0*	4,700
4	50 mM Tris, 2.0 M CaCl ₂ , pH 7.5	6,500
* pH 5.0 fue elegido debido a la solubilidad de MnCl ₂ y NiCl ₂		

Tabla 12: eliminación de IRT con varias soluciones de lavado

Ejecución #	Lavado 1 Condición	IRT %
1	50 mM Tris, 1.0 NaCl, ph 7.5	2.78
2	50mM Acetato Sódico, 1.5 M MnCl ₂ , pH5.0*	0.77
3	50mM Acetato Sódico, 1.5 M NiCl ₂ , pH 5.0*	0.47
4	50 mM Tris, 2.0 M CaCl ₂ , pH 7.5	0.87
* pH 5.0 fue elegido debido a la solubilidad de MnCl ₂ y NiCl ₂		

[0160] La Tabla 11 muestra que el nivel de HCPs presente en los ensayos que fueron lavados con soluciones con cationes divalentes tenía entre 1,5-3,5 veces menos HCPs que el control (lavado de 1,0 M NaCl). La Tabla 12 muestra que los ensayos que contenían los lavados con soluciones de sales catiónicas divalentes también ofrecen más de 3,5 veces de eliminación de IRT en comparación con el ensayo con 1,0 M NaCl con soluciones de lavado. De este modo, estos resultados demostraron que los lavados de sales con otros cationes divalentes (p.ej., MnCl₂ o NiCl₂), distintos de CaCl₂, también resultaron efectivos en la eliminación de impurezas.

[0161] Equivalentes Aquellos profesionales de la materia reconocerán, o podrán determinar, utilizando sólo la experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención aquí descrita. Se pretende que esos equivalentes queden englobadas en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método para purificar un anticuerpo con una región Fc a partir de un líquido fuente que consta del anticuerpo y una o más impurezas, con las siguientes etapas:
- absorber el anticuerpo hacia un agente aglutinador Fc que consta de una o más Proteínas A y Proteínas G;
lavado del agente aglutinador Fc con una solución amortiguadora con CaCl₂ en una concentración de 0,5 M a 3 M para eliminar una o más impurezas; y
10 recuperar el anticuerpo del agente aglutinador Fc mediante la elución del anticuerpo en un búfer de elución con un pH de 2 a 4.
- 15 2.- El método de la reivindicación 1, donde esas impurezas, una o más, se seleccionan del grupo compuesto por: especies variables leídas por intrón (IRT), especies ligadas bajo disulfuro (UDB) y especies de bajo peso molecular (LMW).
- 3.- El método de la reivindicación 2, donde esas impurezas, una o más, es una IRT.
- 20 4.- El método de la reivindicación 1, donde el anticuerpo se selecciona de entre el grupo compuesto por: una fusión de anticuerpos, un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano.
- 5.- El método de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-IL-13.
- 25 6.- El método de la reivindicación 1, donde el anticuerpo liga con un antígeno seleccionado de un grupo compuesto por: CD 3, CD52, VEGF, EGFR, CD33, CD20, HER-2, TNFa, CD25, RSV, IgE, gp IIb/IIIa, CD11 y la integrina α 4.
- 30 7.- El método de la reivindicación 1, donde el anticuerpo con una región Fc ha sido producido mediante recombinación.
- 8.- El método de la reivindicación 7, donde el anticuerpo con una región Fc ha sido producido mediante recombinación en la célula de un ovario de hámster chino (CHO).
- 35 9.- El método de la reivindicación 1, donde el agente aglutinador Fc se inmoviliza en una fase sólida.
- 10.- El método de la reivindicación 9, donde la fase sólida consta de una o más gotículas, un gel, una resina y una partícula.
- 40 11.- El método de la reivindicación 1, donde la solución amortiguadora con CaCl₂ tiene un valor de pH entre 4 y 8.
- 12.- El método de la reivindicación 1, donde la solución amortiguadora con CaCl₂ tiene un valor de pH entre 7,3 y 7,7.
- 45 13.- El método de la reivindicación 1, donde la solución amortiguadora tiene una concentración de CaCl₂ entre 1,5 M y 2,0 M.
- 14.- El método de la reivindicación 1, donde la solución amortiguadora incluye 2 M de CaCl₂.
- 50 15.- El método de la reivindicación 1, donde las etapas de absorción del anticuerpo hacia un agente aglutinador Fc y de lavado del agente aglutinador Fc se realizan a una temperatura entre 2 y 24°C.
- 55 16.- El método de la reivindicación 2, donde una o más impurezas forman parte de una proteína de célula huésped, ADN de una célula huésped, una proteína de cultivo celular o de mezclas de ellos.
- 17.- El método de la reivindicación 1, donde la etapa de recuperación del anticuerpo a partir del agente aglutinador Fc incluye la elución del anticuerpo utilizando un búfer de elución con un pH entre 2,5 a 3,5.
- 60 18.- El método de la reivindicación 1, donde el método incluye además una etapa de cromatografía seleccionada de entre el grupo compuesto por: cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de afinidad metálica inmovilizada y cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).

- 19 .- El método de la reivindicación 1, donde el método incluye una etapa de purificación adicional seleccionada de entre el grupo compuesto por: cromatografía de hidroxapatita, diálisis, cromatografía de afinidad, precipitación de sulfato de amonio, precipitación de etanol, fase HPLC reversa (RP-HPLC), e isoenfoque.
- 5 20 .- El método de la reivindicación 1, donde una o más impurezas incluyen una o más variables leídas por intrón del anticuerpo y la solución de elución con el anticuerpo tiene un nivel de variables leídas por intrón que es al menos 5 veces inferior al nivel de variables leídas por intrón del líquido fuente.
- 10 21 .- El método de la reivindicación 20, donde una solución que contiene el anticuerpo recuperada de la solución de elución tiene un nivel de variables leídas por intrón que es al menos 10 veces inferior al nivel de variables leídas por intrón del líquido fuente.
- 15 22 .- El método de la reivindicación 1, donde una o más impurezas incluyen una o más variables leídas por intrón del anticuerpo y las variables leídas por intrón incluyen menos del 1% de una especie de ese anticuerpo en la solución de elución.
- 20 23 .- El método de la reivindicación 22, donde las variables leídas por intrón constituyen menos del 0,8% de una especie de ese anticuerpo en la solución de elución.
- 25 24 .- El método de la reivindicación 23, donde las variables leídas por intrón constituyen menos del 0,5% de una especie de ese anticuerpo en la solución de elución.
- 30 25 .- El método de la reivindicación 24, donde las variables leídas por intrón constituyen menos del 0,2% de una especie de ese anticuerpo en el líquido de elución.
- 35 26 .- El método de la reivindicación 1, donde una o más impurezas incluyen una o más especies de bajo peso molecular del anticuerpo y las especies de bajo peso molecular constituyen menos del 1% de un tipo de ese anticuerpo en la solución de elución.
- 40 27 .- El método de la reivindicación 26, donde las especies de bajo peso molecular representan menos del 0,8% de una especie de ese anticuerpo en la solución de elución.
- 45 28 .- El método de la reivindicación 27, donde las especies de bajo peso molecular representan menos del 0,5% de una especie de ese anticuerpo en la solución de elución.
- 50 29 .- El método de la reivindicación 28, donde las especies de bajo peso molecular representan menos del 0,2% de una especie de ese anticuerpo en la solución de elución.
- 30 .- El método de la reivindicación 1, donde una o más impurezas incluyen una o más variables ligadas bajo disulfuro del anticuerpo y las variables ligadas bajo disulfuro representan menos del 15% de una especie de ese anticuerpo en la solución de elución.
- 31 .- El método de la reivindicación 30, donde las variables ligadas bajo disulfuro representan menos del 10% de un tipo de ese anticuerpo en la solución de elución.
- 32 .- El método de la reivindicación 31, donde las variables ligadas bajo disulfuro representan menos del 5% de un tipo de ese anticuerpo en la solución de elución.
- 33 .- El método de la reivindicación 32, donde las variables ligadas bajo disulfuro representan menos del 2% de un tipo de ese anticuerpo en la solución de elución.