

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 148**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

**C07K 16/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2008 E 08758815 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2152745**

54 Título: **Purificación de inmunoglobulinas**

30 Prioridad:

**01.06.2007 EP 07010840**

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

**18.03.2014**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
GRENZACHERSTRASSE, 124  
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**FALKENSTEIN, ROBERTO y  
GIESSEL, CLAUDIA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 449 148 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

## Purificación de inmunoglobulinas

5 La presente invención pertenece al campo de la purificación de polipéptidos. Se ha descrito un método para proporcionar una inmunoglobulina en forma monomérica mediante la separación de la inmunoglobulina en solución de impurezas, especialmente de la inmunoglobulina en forma agregada.

## Antecedentes de la invención

10 Las proteínas y especialmente las inmunoglobulinas juegan un papel importante en el portafolio médico actual. Para la aplicación en humanos de cada proteína terapéutica tiene que cumplir con criterios distintos. Para garantizar la seguridad de los agentes biofarmacéuticos para los humanos, los ácidos nucleicos, los virus y las proteínas de la célula huésped, que podrían causar un grave daño, tienen que eliminarse especialmente. Para cumplir con estas especificaciones reglamentarias deben seguirse uno o más pasos de purificación tras el proceso de fabricación. Entre otras cosas, la pureza, la velocidad, y el rendimiento juegan un papel importante en la determinación de un proceso de purificación apropiado.

20 Existen diferentes métodos establecidos y que se utilizan de forma generalizada para la purificación de proteínas, tales como la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo, cromatografía de afinidad de proteína G o proteína A), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de sulfopropilo o carboximetilo), de intercambio de aniones (resinas de amino etilo) y de intercambio iónico de modo mixto), adsorción tiofílica (por ejemplo, con betamercaptoetanol y otros ligandos SH), de interacción hidrofóbica o cromatografía de adsorción aromática (por ejemplo con resinas de fenilsefariosa, aza arenofílicas, o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad de quelato de metal (por ejemplo con material de afinidad Ni (II) y Cu (II)), cromatografía de exclusión por tamaño, y métodos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

30 Necina, R., et al. (Biotechnol. Bioeng. 60 (1998) 689-698) describe la captura de anticuerpos monoclonales humanos directamente a partir de sobrenadantes de cultivo de células mediante el intercambio iónico que presenta una alta densidad de carga. En el documento WO 89 / 05157 se describe un método para la purificación de productos de inmunoglobulinas sometiendo directamente el medio de cultivo celular a un tratamiento de intercambio catiónico. Una purificación de anticuerpos IgG monoclonales de un solo paso a partir de ascites de ratón se describe por Danielsson, A., et al., J. Immun. Meth. 115 (1988), 79-88.

35 Mhatre, R. et al. (J. Chrom. A 707 (1995) 225-231), exploró la purificación de los fragmentos Fab de anticuerpos mediante la cromatografía de intercambio catiónico y elución en gradiente de pH.

40 El documento WO 94 / 00561 describe anticuerpos monoclonales humanos anti-rhesus y líneas celulares que las producen. Un método para purificar un polipéptido por cromatografía de intercambio de iones se describe en el documento WO 2004 / 024866 en el que se utiliza un gradiente de lavado para resolver un polipéptido de interés a partir de uno o más contaminantes. Schwarz, A. y col. (Laborpraxis 21 (1997) 62-66) describen la purificación de anticuerpos monoclonales con una columna CM-HyperD.

45 El documento WO 2004 / 076485 describe un proceso para la purificación de anticuerpos mediante la proteína A y la cromatografía de intercambio iónico. En el documento PE 0 530 447 se describe un proceso para la purificación de anticuerpos monoclonales de IgG mediante una combinación de tres pasos cromatográficos. La eliminación de la proteína A a partir de preparaciones de anticuerpos se describe en US 4.983.722.

50 Los procesos de anticuerpos monoclonales recombinantes a menudo emplean cromatografía de intercambio aniónico para unirse a niveles traza de impurezas y contaminantes potenciales, tales como DNA, proteínas de la célula huésped, y virus, al tiempo que permiten que el anticuerpo fluya de forma continua (Knudsen, H.L., et al., J. Chrom. A 907 (2001) 145-154).

55 El documento WO 95/16037 describe la purificación de los anticuerpos monoclonales biespecíficos anti-EGF-R/anti-CD3 a partir de hibridoma híbrido realizado mediante la cromatografía de intercambio catiónico de proteína A. La separación de monómeros de anticuerpos de sus multímeros mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico se describe en el documento PE 1 084 136. US 5.429.746 se refiere a la aplicación de la cromatografía de combinación de cromatografía de interacción hidrofoba a la purificación de moléculas de proteínas de anticuerpos.

60 Se describe en US 4.604.208 una membrana microporosa aniónica modificada para su uso en la filtración de líquidos, especialmente en líquidos biológicos o parenterales contaminados con partículas cargadas. El documento WO 03 / 040166 describe una membrana y un dispositivo diseñados para la eliminación de trazas de impurezas en corrientes que contienen proteínas.

65

Un método para recuperar un polipéptido se describe en US 6.716.598. En US 2006 / 0194953 se describe un método para eliminar selectivamente proteína A filtrada de un anticuerpo purificado por medio de cromatografía de afinidad de proteína A.

5 En el documento WO 2006 / 096489 se describe una composición de anticuerpo anti-M-CSF que tiene niveles reducidos de endotoxina. Un método para la purificación de proteínas libre de células del caldo de cultivo o tejido usando un método de unión y elución se describe en JP7155194. Fischer-Fruehholz, S., describe en una presentación aplicaciones de membranas adsorbentes Sartobind (26 de abril de 2006, artículo de internet). En el documento WO 2006 / 024497 se describe cromatografía de intercambio de iones mediante pulsos de afinidad para purificar los anticuerpos, especialmente la eliminación de la proteína A filtrada. La tarea práctica de la purificación de IgG monoclonal con hidroxapatita cerámica CHT se describe por Gagnon, P., et al. (11ª Conferencia Anual de Waterside, mayo de 2006). Fahrner, R. L., et al. Describen la purificación industrial de anticuerpos farmacéuticos, especialmente el desarrollo, el funcionamiento y la validación de los procesos de cromatografía que comprenden un paso de cromatografía de intercambio catiónico en modo de unión y elución (Biotechnol. Gen. Eng. Rev. 18 (2001) 301-327).

#### Resumen de la invención

20 La presente invención comprende múltiples aspectos en el campo de la purificación de inmunoglobulinas. Un aspecto es un método para la purificación de una inmunoglobulina que comprende el paso de aplicar una solución acuosa, tamponada que comprende una inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada a un material de membrana de intercambio catiónico bajo condiciones en las que al menos el 90 % de la inmunoglobulina en forma monomérica no se une al material de membrana de intercambio de cationes, y recuperar la inmunoglobulina en forma monomérica de la solución después del contacto con el material de membrana de intercambio de cationes, en el que dicho paso es un paso cromatográfico, operado en modo de flujo continuo y dicha solución acuosa, tamponada tiene un valor de pH desde pH 4 a pH 8 y dicha solución acuosa, tamponada tiene una conductividad de 1,0 a 15,0 mS / cm y la suma del valor de pH y la conductividad en mS / cm de la solución acuosa, tamponada está en el intervalo de 10 a 15.

30 En una forma de realización el método comprende, de acuerdo con la invención, un paso más, ya sea antes o después del paso de intercambio catiónico, de la aplicación de una solución acuosa, tamponada que comprende una inmunoglobulina en forma monomérica y / o en forma agregada a un material de intercambio aniónico bajo condiciones en las que la inmunoglobulina no se une al material de intercambio aniónico, y se recupera la inmunoglobulina desde el flujo del material de intercambio aniónico. En una realización, dicho paso es un paso cromatográfico que opera en modo de flujo continuo.

40 En otra forma de realización el método comprende, de acuerdo con la invención, ya sea antes del paso de intercambio de cationes o antes del paso de intercambio de aniones el paso adicional de aplicar una solución acuosa, tamponada que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica y forma agregada a una columna de afinidad bajo condiciones en las que la inmunoglobulina se une a la columna de afinidad, y se recupera la inmunoglobulina en forma monomérica y forma agregada de la columna de afinidad. En una realización, dicho paso es un paso cromatográfico que opera en modo de unión y elución.

45 En una forma de realización adicional del método de acuerdo con la presente invención comprende el método como paso de intercambio catiónico el paso de aplicar una solución acuosa tamponada que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica y agregada a un material de membrana de intercambio catiónico bajo condiciones que permitan a la inmunoglobulina en forma monomérica no unirse al material de intercambio catiónico de la membrana, y recuperar la inmunoglobulina en forma monomérica del flujo del material de membrana de intercambio de cationes. En otra realización, el material de intercambio catiónico de la membrana es Mustang™ S, Mustang™ C, Sartobind™ S, o Sartobind™ C. En aún otra realización el material de membrana de intercambio catiónico es una membrana de polietersulfona o basado en una membrana de celulosa regenerada modificada con grupos de ácido sulfónico o grupos carboximetilo. En una realización, la solución tiene un valor de pH entre pH 5 y pH 8. En aún otra realización, la solución tiene una conductividad desde 4,0 mS / cm a 10,0 mS / cm.

55 Otra realización comprende que la recuperación de dicha inmunoglobulina en forma monomérica del flujo es mediante un método seleccionado a partir de la precipitación, desplazamiento salino, ultrafiltración, diafiltración, liofilización, cromatografía de afinidad, o la reducción de volumen de disolvente para obtener una solución concentrada. Preferiblemente, dicha recuperación es por ultrafiltración, liofilización, o reducción de volumen de disolvente.

60 En otra forma de realización dicha inmunoglobulina se obtiene a partir del flujo del material de la membrana de intercambio catiónico y al menos el 95 % de la inmunoglobulina está en forma monomérica. Una forma de realización es que la solución acuosa, tamponada es una solución que comprende ácido fosfórico o sales del mismo, ácido cítrico o sales del mismo, o histidina o sales del mismo. En otra realización, la solución acuosa, tamponada comprende cloruro de sodio o cloruro de potasio. Y en aún otra realización, el paso cromatográfico es una cromatografía en columna o una cromatografía de casete.

## Descripción detallada de la invención

El término "material de intercambio iónico" o equivalentes gramaticales del mismo tal como se utiliza en esta solicitud implica una matriz inmóvil de peso molecular elevado que lleva sustituyentes cargados unidos covalentemente. Para la neutralidad de carga global, contraiones unidos de forma no covalente están unidos a los sustituyentes cargados por interacción iónica. El "material de intercambio iónico" tiene la capacidad de intercambiar sus contraiones unidos de forma no covalente por parejas de unión con carga similar o iones de la solución circundante. Dependiendo de la carga de sus contraiones intercambiables el "material de intercambio iónico" se denomina como "material de intercambio catiónico" o como "material de intercambio aniónico". Dependiendo de la naturaleza del grupo cargado (sustituyente) el "material de intercambio iónico" se refiere como, por ejemplo, en el caso de materiales de intercambio catiónico, ácido sulfónico o resina de sulfopropilo (S), o resina de carboximetilo (CM). Dependiendo de la naturaleza química del grupo cargado / sustituyente del "material de intercambio iónico", además, se puede clasificar como material de intercambio iónico fuerte o débil, dependiendo de la fuerza del sustituyente cargado unido covalentemente. Por ejemplo, materiales de intercambio de cationes fuertes tienen un grupo de ácido sulfónico, preferiblemente un grupo sulfopropilo, como sustituyente cargado, materiales de intercambio catiónico débiles tienen un grupo ácido carboxílico, preferiblemente un grupo carboximetilo, como sustituyente cargado. Materiales de intercambio de aniones fuertes tienen un grupo amonio cuaternario, y materiales de intercambio de aniones débiles tienen un grupo dietilaminoetilo como sustituyente cargado.

El término "membrana", como se usa en esta solicitud denota tanto una membrana microporosa o macroporosa. La membrana en sí se compone de un material polimérico tal como, por ejemplo, polietileno, polipropileno, copolímeros de etileno acetato de vinilo, politetrafluoroetileno, policarbonato, poli cloruro de vinilo, poliamidas (nilón, por ejemplo Zetapore™, N<sub>66</sub> Posidyne™), poliésteres, acetato de celulosa, celulosa regenerada, composites de celulosa, polisulfonas, polietersulfonas, poliarilsulfonas, polifenilsulfonas, poliacrilonitrilo, fluoruro de polivinilideno, telas no tejidas y tejidas de material fibroso (por ejemplo Tyvek®), o de un material inorgánico tal como zeolita, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, o hidroxiapatita. En una forma de realización es la membrana una membrana de polietersulfona o una membrana de celulosa regenerada.

Las resinas de intercambio iónico están disponibles bajo diferentes nombres y de una multitud de empresas como por ejemplo resinas de intercambio catiónico Bio-Rex® (por ejemplo, tipo 70), Chelex® (por ejemplo, tipo 100), Macro-Prep® (por ejemplo, tipo CM, High S, 25 S), AG® (por ejemplo, tipo de 50W, MP) todo disponible de laboratorios BioRad, WCX 2 disponible de Ciphergen, Dowex® MAC-3 disponible en la empresa Dow chemical, Mustang C y Mustang S disponible de Pall Corporation, celulosa CM (por ejemplo, tipo 23, 52), hiper-D, Partisphere disponible en Whatman plc., Amberlite® IRC (por ejemplo, tipo 76, 747, 748), Amberlite® GT 73, Toyopearl® (por ejemplo, tipo SP, CM, 650M) todos disponibles de Tosoh Bioscience GmbH, CM 1500 y CM 3000 disponible de BIOCHROM Labs, SP-Sepharose™, CM-Sepharose™ disponible de GE Healthcare, resinas Poros disponibles de PerSeptive Biosystems, Asahipak ES (por ejemplo, tipo 502C), CXpak P, IEC CM (por ejemplo, tipo 825, 2825, 5025, LG), IEC SP (por ejemplo, tipo 420N, 825), IEC QA (por ejemplo, tipo LG, 825), disponible de Shoko America Inc., 50W resina de intercambio catiónico disponible Eichrom Technologies Inc., y como ejemplo, resinas de intercambio aniónico como Dowex® 1 disponible de Dow Chemical Company,® (por ejemplo, tipo 1, 2, 4), Bio - Rex® 5, DEAE Bio-Gel 1, Macro-Prep® DEAE todos disponibles de BioRad Laboratories, resina de intercambio aniónico AG de tipo 1 disponible de Eichrom Technologies Inc., Source Q, ANX Sepharose 4, DEAE Sepharose (por ejemplo, tipo CL-6B, FF), Q Sepharose, Capto Q, Capto S todos disponibles de GE Healthcare, AX-300 disponible de PerkinElmer, Asahipak ES-502C, AXpak WA (por ejemplo, tipo 624, G), IEC DEAE todos disponibles en Shoko America Inc., Amberlite® IRA-96, Toyopearl® DEAE, TSKgel DEAE todos disponibles de Tosoh Bioscience GmbH, Mustang Q disponible de Pall Corporation. En un material de intercambio iónico de membrana, los sitios de unión se pueden encontrar en las paredes de los poros de flujo continuo y no se ocultan dentro de los poros de difusión permitiendo la transferencia de masa por convección de difusión. Los materiales de intercambio iónico de membrana están disponibles bajo diferentes nombres de algunas empresas, como por ejemplo, Sartorius (material de membrana de intercambio catiónico: Sartobind™ CM, Sartobind™ S, material de membrana de intercambio de aniones: Sartobind™ Q) o Pall Corporation (material de membrana de intercambio catiónico: Mustang™ S, Mustang™ C, material de membrana de intercambio de aniones: Mustang™ Q) o Pall BioPharmaceuticals. En otra realización, el material de intercambio catiónico de la membrana es Sartobind™ CM, o Sartobind™ S, o Mustang™ S, o Mustang™ C. En otra realización, el material de intercambio de cationes de la membrana es una membrana de polietersulfona o basado en una membrana de celulosa regenerada modificada con grupos de ácido sulfónico o grupos carboximetilo. En aún otra realización, el material de intercambio de aniones es un material de membrana de intercambio de aniones de tipo Q (de tipo grupo amonio cuaternario) o columna de intercambio aniónico Q.

Un "polipéptido" es un polímero de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya sea producido naturalmente o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos se conocen como "péptidos".

Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas de polipéptido o una cadena polipeptídica de más de 100 residuos de aminoácidos. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. Grupos de carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden ser añadidos a

una proteína por la célula en la que se produce la proteína, y variará con el tipo de célula. Las proteínas se definen aquí en términos de sus estructuras de cadena principal de aminoácidos; los sustituyentes tales como grupos carbohidrato no se especifican generalmente, pero no obstante, pueden estar presentes.

5 El término "inmunoglobulina" y equivalentes gramaticales de los mismos que pueden utilizarse de forma intercambiable dentro de esta aplicación comprenden al menos dos cadenas polipeptídicas ligeras y dos cadenas polipeptídicas pesadas. Cada una de las cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras contienen una región variable (generalmente la porción amino terminal de las cadenas polipeptídicas) que contiene un dominio de unión para la interacción con un antígeno. Cada una de las cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras también comprenden una  
10 región constante (generalmente la porción carboxilo terminal de las cadenas polipeptídicas) que puede mediar en la unión del anticuerpo al tejido o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmune, algunas células fagocíticas y un primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Típicamente, las cadenas ligeras y pesadas de polipéptidos son cadenas que consisten esencialmente de una región variable, es decir,  $V_L$  o  $V_H$ , y una región constante, es decir, de  $C_L$  en caso de una cadena de polipéptido de luz, o de  $C_H1$ , bisagra,  $C_H2$ ,  $C_H3$ , y  
15 opcionalmente  $C_H4$  en el caso de una cadena polipeptídica pesada.

Tal como se usa en este documento, el término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste de uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los diferentes genes de la región constante, así como los innumerables genes de la región variable de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden existir en una variedad de formas, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab, y F(ab)<sub>2</sub>, así como cadenas simples (por ejemplo, Huston, J.S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 5879-5883; Bird, R.E., et al., Science 242 (1988) 423-426; y, en general, Hood et al, Immunology, Benjamin N.Y., segunda edición (1984); y Hunkapiller, T., y Hood, L., Nature 323 (1986) 15-16). En una realización las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención comprenden anticuerpos monoclonales y fragmentos de los  
20 mismos, por ejemplo cadenas pesadas o ligeras aisladas o cadenas pesadas o ligeras fusionadas a un péptido o polipéptido adicional, y también fragmentos de los mismos.

El término "inmunoglobulina en forma monomérica" y sus equivalentes gramaticales denota una molécula de inmunoglobulina que no está asociada con una segunda molécula de inmunoglobulina, es decir, la molécula de inmunoglobulina no está unida de forma covalente ni no covalente a una segunda molécula de inmunoglobulina. El término "inmunoglobulina en forma agregada" y sus equivalentes gramaticales denota una molécula de inmunoglobulina que está asociada, ya sea de forma covalente o no covalente, con al menos una molécula de inmunoglobulina adicional. Una inmunoglobulina en forma agregada se eluye como un único pico a partir de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño. El término "en forma monomérica" y sus equivalentes gramaticales tal como se utiliza en esta solicitud denota no necesariamente que el 100 % de una molécula de inmunoglobulina está presentes en forma monomérica. Además, denota que de una inmunoglobulina al menos el 90 % de la inmunoglobulina está en forma monomérica, al menos el 95 % de la inmunoglobulina está en forma monomérica, al menos el 98 % de la inmunoglobulina está en forma monomérica, al menos el 99 % de la inmunoglobulina está en forma monomérica, o más del 99 % de la inmunoglobulina está en forma monomérica. El término "en forma monomérica y en forma agregada" denota una mezcla de moléculas de inmunoglobulina no asociadas con otras moléculas de inmunoglobulina y de las moléculas de inmunoglobulina asociadas con otras moléculas de inmunoglobulina. En esta mezcla, ni la forma monomérica ni la forma agregada se encuentran presentes de forma exclusiva.

45 El término "100%", tal como se usa en esta solicitud significa que la cantidad de componentes que no sean un componente especificado se encuentran por debajo del límite de detección del método analítico al que se refiere en las condiciones especificadas.

50 Los términos "90 %", "95 %", "98 %", "99 %" como se usa en esta solicitud no denotan valores exactos, pero los valores dentro de la precisión del método analítico bajo las condiciones especificadas.

Los métodos cromatográficos generales y su uso son conocidos por una persona experta en la técnica. Véase, por ejemplo, chromatography, quinta edición, Parte A: Fundamentals and Techniques, Heftmann, E. (ed.), Elsevier Science Publishing Company, Nueva York, (1992); Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences, Deyl, Z. (ed), Elsevier Science BV, Amsterdam, Países Bajos, (1998); Chromatography Today, Poole, C.F., y Poole, S.K., Elsevier Science Publishing Company, Nueva York, (1991); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (1982); Sambrook, J., et al. (ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M., et al. (eds), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

60 Para la purificación de inmunoglobulinas producidas de forma recombinante a menudo se emplea una combinación de diferentes pasos cromatográficos en columna. En general, una cromatografía de afinidad de proteína A es seguida por uno o dos pasos de separación adicionales. El paso de purificación final es lo que se denomina "paso de pulido" para la eliminación de trazas de impurezas y contaminantes como inmunoglobulinas agregadas, HCP residual (proteína de la célula huésped), DNA (ácido nucleico de la célula huésped), virus, o endotoxinas. Para este paso de pulido a menudo se utiliza un material de intercambio de aniones en un modo de flujo continuo.

El término "modo de flujo continuo" y sus equivalentes gramaticales tal como se utiliza en la presente invención denota un modo de funcionamiento de un método de purificación, por ejemplo, un método cromatográfico, en el que una solución que contiene una sustancia de interés, por ejemplo, una inmunoglobulina en forma monomérica, a purificar se pone en contacto con una fase estacionaria, preferiblemente un sólido, con lo cual la sustancia de interés no se une a esta fase estacionaria. Como resultado se obtiene la sustancia de interés, ya sea en el flujo continuo (si el método de purificación es un método cromatográfico) o en el sobrenadante (si el método de purificación es un método por lotes). Las sustancias que no son de interés, por ejemplo, una inmunoglobulina en forma agregada, que también estaba presente en la solución, se unen a la fase estacionaria y son de ese modo eliminadas de la solución. Esto no implica necesariamente que 100 % de las sustancias que no son de interés se eliminen de la solución, pero esencialmente el 100 % de las sustancias que no son de interés se eliminan, es decir, al menos el 50 % de las sustancias que no son de interés se eliminan de la solución, al menos el 75 % de las sustancias que no son de interés se eliminan de la solución, al menos el 90 % de las sustancias que no son de interés se eliminan de la solución, o más del 95 % de las sustancias que no son de interés se eliminan de la solución.

El término "aplicar a" y sus equivalentes gramaticales tal como se utiliza en esta aplicación significa un paso parcial de un método de purificación, en el que se pone en contacto una solución que contiene una sustancia de interés para ser purificada con una fase estacionaria. Esto indica que a) la solución se añade a un dispositivo cromatográfico en el que se encuentra la fase estacionaria, o b) que una fase estacionaria se añade a la solución. En el caso a) la solución que contiene la sustancia de interés a ser purificado pasa a través de la fase estacionaria que permite una interacción entre la fase estacionaria y de las sustancias en solución. Dependiendo de las condiciones, tales como por ejemplo pH, conductividad, concentración de sal, temperatura, y / o la tasa de flujo, algunas sustancias de la solución se unen a la fase estacionaria y por lo tanto se eliminan de la solución. Otras sustancias permanecen en solución. Las sustancias que permanecen en solución se pueden encontrar en el flujo continuo. El "flujo continuo" indica la solución obtenida después del paso del dispositivo cromatográfico. Preferiblemente, el dispositivo cromatográfico es una columna, o un casete. En una realización, el paso cromatográfico es una cromatografía de columna, es decir, un paso cromatográfico usando una fase sólida en una columna, o una cromatografía de casete, es decir, un paso cromatográfico usando una fase sólida en un casete. En una realización preferida la cromatografía de casete emplea una membrana en un casete. La sustancia de interés no unida a la fase estacionaria puede recuperarse en una forma de realización del flujo mediante métodos familiares para una persona experta en la materia, tales como por ejemplo, precipitación, precipitación salina, ultrafiltración, diafiltración, liofilización, cromatografía de afinidad, o reducción de volumen de disolvente para obtener una solución concentrada. En una forma de realización preferida está la inmunoglobulina en forma monomérica recuperada del flujo continuo de liofilización, ultrafiltración, o reducción de volumen de disolvente. En el caso b) se añade la fase estacionaria, por ejemplo, como un polvo, a la solución que contiene la sustancia de interés a ser purificada lo que permite una interacción entre la fase estacionaria y las sustancias en solución. Después de la interacción de la fase estacionaria se retira, por ejemplo, mediante filtración, y la sustancia de interés no unida a la fase estacionaria se obtiene en el sobrenadante.

El término "no se une a" y sus equivalentes gramaticales tal como se utiliza en esta solicitud indica que una sustancia de interés, por ejemplo, una inmunoglobulina, permanece en solución cuando se ponen en contacto con una fase estacionaria, por ejemplo, un material de intercambio de iones. Esto no significa necesariamente que el 100% de la sustancia de interés permanece en solución pero esencialmente el 100 % de la sustancia de interés permanece en solución, es decir, al menos el 50 % de la sustancia de interés permanece en solución y no se une a la fase estacionaria, al menos el 65 % de la sustancia de interés permanece en solución y no se une a la fase estacionaria, al menos el 80 % de la sustancia de interés permanece en solución y no se une a la fase estacionaria, al menos el 90 % de la sustancia de interés permanece en solución y no se une a la fase estacionaria, o más del 95 % de la sustancia de interés permanece en solución y no se une a la fase estacionaria.

El término "tamponado", tal como se usa en esta solicitud denota una solución en la que los cambios de pH debido a la adición o liberación de sustancias ácidas o básicas se nivela por una sustancia tampón. Una solución que comprende una sustancia tampón es una "solución tamponada". Cualquier sustancia tampón que proporciona un efecto de este tipo puede utilizarse. En una forma de realización se utilizan sustancias tampón farmacéuticamente aceptables, tales como por ejemplo, ácido fosfórico y sus sales, ácido cítrico y sales de los mismos, morfina, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico y sus sales, histidina y sus sales, glicina y sus sales, o tris (hidroximetil) aminometano (TRIS) y su sales. En una forma de realización preferida la sustancia tampón es el ácido fosfórico y / o sus sales, ácido cítrico y / o sus sales, o histidina y / o sus sales. Opcionalmente, la solución tamponada puede comprender una sal adicional, como por ejemplo, cloruro de sodio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, sulfato de potasio, citrato de sodio, o citrato de potasio. En una forma de realización comprende la solución tamponada cloruro de sodio o cloruro de potasio.

El término "modo de unión y elución" tal como se utiliza en la presente invención denota un modo de funcionamiento de un método de purificación, en el que se pone una solución que contiene una sustancia de interés para ser purificada en contacto con una fase estacionaria, preferiblemente una fase sólida, por lo que la sustancia de interés se une a la fase estacionaria. Como resultado, la sustancia de interés se retiene en la fase estacionaria mientras que las sustancias que no son de interés se eliminan con el flujo continuo o en el sobrenadante. La sustancia de interés

opcionalmente después de una etapa de lavado se eluye de la fase estacionaria en un segundo paso y de este modo se recupera de la fase estacionaria con una solución de elución.

5 Para la separación de las inmunoglobulinas en forma monomérica de las inmunoglobulinas en forma agregada se utilizan métodos generalmente cromatográficos que emplean materiales de intercambio catiónico operados en un modo de unión y elución, véase por ejemplo, WO 2006/125599. Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que los materiales de intercambio catiónico operados en un modo de flujo continuo se pueden utilizar para la eliminación de inmunoglobulinas en forma agregada a partir de soluciones que contienen inmunoglobulinas en forma monomérica y agregada. Con este método para la purificación de una inmunoglobulina es posible eliminar inmunoglobulinas en forma agregada en una forma rápida y fácil a partir de soluciones que contienen una mezcla de inmunoglobulinas tanto en forma monomérica y en forma agregada.

10 Por lo tanto, la presente invención describe un método para la purificación de una inmunoglobulina, en el que el método comprende el siguiente paso:

15 a) aplicar una solución acuosa, tamponada que comprende una inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada a un material de membrana de intercambio catiónico bajo condiciones en las que la inmunoglobulina en forma monomérica no se une a la membrana de material de intercambio catiónico, y recuperar la inmunoglobulina en forma monomérica de la solución después de contactar con el material de membrana de intercambio de cationes.

20 En más detalle, la presente invención comprende un método para obtener una inmunoglobulina en forma monomérica a partir de una solución que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada, por lo que el método comprende el paso de aplicar una solución acuosa, tamponada que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada a un material de membrana de intercambio catiónico bajo condiciones en las que la inmunoglobulina en forma monomérica no se une al material de intercambio catiónico, y se recupera la inmunoglobulina en forma monomérica de la solución después del contacto con el material de membrana de intercambio de cationes. En una realización, dicho paso es un paso cromatográfico que opera en modo de flujo continuo.

25 El término "condiciones en las que la inmunoglobulina en forma monomérica no se une al material de intercambio catiónico" y equivalentes gramaticales del mismo tal como se utiliza en esta solicitud denota que una inmunoglobulina en forma monomérica permanece en solución cuando se pone en contacto con el material de intercambio catiónico. Esto no significa necesariamente que el 100% de la inmunoglobulina en forma monomérica permanezca en solución pero esencialmente el 100 % de la inmunoglobulina en forma monomérica permanece en solución y no se une al material de intercambio catiónico, es decir, al menos el 50 % de la inmunoglobulina en forma monomérica permanece en solución y no se une al material de intercambio catiónico, por lo menos el 65 % de la inmunoglobulina en forma monomérica permanece en solución y no se une al material de intercambio catiónico, al menos el 80 % de la inmunoglobulina en forma monomérica permanece en solución y no se une al material de intercambio catiónico, al menos el 90 % de la inmunoglobulina en forma monomérica permanece en solución y no se une al material de intercambio catiónico, o más del 95 % de la inmunoglobulina en forma monomérica permanece en solución y no se une al material de intercambio catiónico. Dichas condiciones son, por ejemplo en una realización un valor de pH de la solución acuosa, tamponada de pH 5 a pH 8 y / o en otra forma de realización una conductividad de la solución acuosa tamponada desde 1,0 mS / cm a 15 mS / cm, preferiblemente de 4,0 mS / cm a 10,0 mS / cm.

30 En una forma de realización de la presente invención comprende el método para la purificación de una inmunoglobulina el paso de aplicar una solución acuosa, tamponada que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada a un material de membrana de intercambio catiónico bajo condiciones en las que la inmunoglobulina en forma monomérica no se une con el material de membrana de intercambio de cationes, y se recupera la inmunoglobulina en forma monomérica del flujo continuo del material de membrana de intercambio de cationes.

35 En esta forma de realización el método de purificación es un método cromatográfico que opera en modo de flujo continuo, lo que permite una rápida purificación de la inmunoglobulina, debido a que la inmunoglobulina deseada en forma monomérica se puede obtener fácilmente desde el flujo continuo de la columna, haciendo pasos adicionales, tales como el lavado de la columna, la elución de la sustancia unida, o la desalación de la solución de inmunoglobulina eluida, innecesaria.

40 El método de acuerdo con la invención se puede emplear como un método de un solo paso o en combinación con otros pasos, tales como, por ejemplo, en una realización con un paso de cromatografía de intercambio aniónico, o con un paso de cromatografía de afinidad en otra forma de realización.

45 Por lo tanto, una realización de la presente invención es un método para la purificación de una inmunoglobulina, en el que el método comprende los siguientes pasos secuenciales:

5 b) aplicar una solución acuosa, tamponada que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada a una columna de cromatografía de intercambio aniónico en condiciones en las que la inmunoglobulina no se une al material de intercambio aniónico, y se recupera la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada del flujo continuo de la columna de intercambio de aniones como una solución acuosa, tamponada, y

10 a) aplicar la solución acuosa, tamponada obtenida en el paso b) que comprende una inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada a un material de membrana de intercambio catiónico bajo condiciones en las que la inmunoglobulina en forma monomérica no se une a la membrana de material de intercambio catiónico, y se recupera la inmunoglobulina en forma monomérica de la solución después del contacto con el material de membrana de intercambio de cationes.

15 En una forma de realización el paso b) es un método cromatográfico que opera en modo de flujo continuo. En otra forma de realización el paso a) es un método cromatográfico que opera en modo de flujo continuo. Las condiciones para el paso b) son conocidos por una persona experta en la materia. Con el paso b) es posible reducir la cantidad de proteína de la célula huésped (HCP), proteína A, endotoxinas, y / o virus en la solución que contiene la inmunoglobulina. También es posible invertir el orden de los dos pasos de intercambio de iones. Antes de la aplicación de una solución a un paso del método de purificación (o a un paso posterior) se tienen que ajustar los parámetros, tales como por ejemplo, el valor del pH o la conductividad de la solución. En una realización, el valor de pH de la solución acuosa aplicada en el paso a) es desde pH 4 a pH 8, preferiblemente desde pH 5 a pH 8. En otra forma de realización la conductividad de la solución acuosa es desde 4,0 mS / cm a 10,0 mS / cm.

20 Adicionalmente, la presente invención comprende en una realización un método para la purificación de una inmunoglobulina, en el que el método comprende los siguientes pasos secuenciales:

25 a) aplicar una solución acuosa, tamponada que comprende una inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada a un material de membrana de intercambio catiónico bajo condiciones en las que la inmunoglobulina en forma monomérica no se une a la membrana de material de intercambio catiónico, y se recupera la inmunoglobulina en forma monomérica de la solución después del contacto con el material de membrana de intercambio de cationes, y

30 c) aplicar la solución acuosa, tamponada de el paso a) que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica a una columna de cromatografía de intercambio aniónico en condiciones en las que la inmunoglobulina no se une al material de intercambio aniónico, y se recupera la inmunoglobulina en forma monomérica del flujo continuo de la columna de cromatografía de intercambio aniónico.

35 En una forma de realización el paso c) es un método cromatográfico que opera en modo de flujo continuo. En otra forma de realización el paso a) es un método cromatográfico que opera en modo de flujo continuo. Puede ser útil, por ejemplo, para eliminar la mayor parte de las proteínas de la célula huésped y productos secundarios del cultivo en otro paso de purificación empleando una cromatografía de afinidad.

40 Una realización de la presente invención es un método que comprende los pasos siguientes en este orden :

45 d) aplicar una solución acuosa, tamponada que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada a una columna de afinidad bajo condiciones en las que la inmunoglobulina se une a la columna de afinidad, y se recupera la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada de la columna de afinidad como una solución acuosa, tamponada, y

50 b) aplicar opcionalmente la solución acuosa, tamponada obtenida en el paso d) que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada a una columna de cromatografía de intercambio aniónico en condiciones en las que la inmunoglobulina no se une al material de intercambio aniónico, y se recupera la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada desde el flujo continuo de la columna de intercambio de aniones como una solución acuosa, tamponada, y

55 a) aplicar la solución acuosa, tamponada, ya sea obtenida en el paso d) u obtenida en el paso b) que comprende una inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada a un material de membrana de intercambio catiónico bajo condiciones en las que la inmunoglobulina en forma monomérica no se une al material de la membrana de intercambio de cationes, y se recupera la inmunoglobulina en forma monomérica de la solución después del contacto con el material de membrana de intercambio de cationes.

60 En una forma de realización el paso b) es un método cromatográfico que opera en modo de flujo continuo. En otra forma de realización el paso a) es un método cromatográfico que opera en modo de flujo continuo. En otra forma de realización de el paso d) es operado en el modo de unión y elución. La columna de afinidad puede ser, por ejemplo una columna de afinidad de proteína A, una columna de afinidad de proteína G, una columna de cromatografía de inducción de carga hidrófoba (HCIC), o una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por ejemplo

con resinas de fenil-sefara, aza-arenofílicas, o ácido m-aminofenilborónico). Preferentemente la columna de afinidad es una columna de proteína A o una columna de HCIC.

5 En una forma de realización adicional se aplica la solución tamponada acuosa que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada en el paso b) y / o la solución tamponada acuosa que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica en el paso c) a una columna de cromatografía de intercambio aniónico en condiciones en las que la inmunoglobulina no se une al material de intercambio aniónico, y se recupera a partir del material de intercambio de aniones como una solución acuosa, tamponada.

10 Un aspecto de la invención es un método para obtener una inmunoglobulina en forma monomérica a partir de una solución que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada, por lo que este método comprende el siguiente paso:

15 a) un paso cromatográfico que opera en modo de flujo continuo que comprende aplicar una solución acuosa, tamponada que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada a un material de membrana de intercambio catiónico bajo condiciones en las que la inmunoglobulina en forma monomérica no se une al material de intercambio catiónico, la inmunoglobulina en forma monomérica se recupera del flujo continuo del material de membrana de intercambio de cationes.

20 En una realización, el método de acuerdo con la invención comprende antes del paso a) el paso siguiente:

25 b) un paso cromatográfico que opera en modo de flujo continuo que comprende aplicar una solución acuosa, tamponada que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada a una columna de cromatografía de intercambio aniónico en condiciones en las que la inmunoglobulina no se une al material de intercambio aniónico, y se recupera la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada desde el flujo continuo de la columna de intercambio de aniones como una solución acuosa, tamponada.

En una realización, el método de acuerdo con la invención comprende después del paso a) el paso siguiente:

30 c) un paso cromatográfico que opera en modo de flujo continuo que comprende la aplicación de la solución acuosa, tamponada obtenida en el paso a) que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica a una columna de cromatografía de intercambio aniónico en condiciones en las que la inmunoglobulina no se une al material de intercambio aniónico, y se recupera la inmunoglobulina en forma monomérica del flujo continuo de la columna de cromatografía de intercambio aniónico.

35 En otra realización, el método de acuerdo con la invención comprende antes del paso a) o el paso b) el paso siguiente:

40 d) un paso cromatográfico que opera en modo de unión y elución que comprende la aplicación de una solución acuosa, tamponada que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada a una columna de afinidad bajo condiciones en las que la inmunoglobulina se une a la columna de afinidad, y se recupera la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada de la columna de afinidad como una solución acuosa, tamponada.

45 En otra realización, la recuperación de dicha inmunoglobulina en forma monomérica del flujo continuo es mediante un método seleccionado a partir de la precipitación, desplazamiento salino, ultrafiltración, diafiltración, liofilización, cromatografía de afinidad, o reducción de volumen de disolvente para obtener una solución concentrada. Preferiblemente, dicha recuperación es por ultrafiltración, liofilización, o reducción de volumen de disolvente.

50 En una realización, la inmunoglobulina obtenida a partir del flujo continuo del material de membrana de intercambio de cationes es al menos un 95 % de inmunoglobulina en forma monomérica. En otra forma de realización al menos el 90 % de la inmunoglobulina en forma monomérica no se une al material de intercambio catiónico.

55 En aún otra realización, el valor de pH de la solución acuosa, tamponada es desde pH 5 a pH 8. En otra forma de realización la conductividad de la solución acuosa, tamponada es desde 4,0 mS / cm a 10,0 mS / cm. En una realización, la solución tamponada es una solución que comprende ácido fosfórico o sales del mismo, ácido cítrico o sales del mismo, o histidina o sales de la misma. En aún otra realización, la solución acuosa comprende cloruro de sodio o cloruro de potasio.

60 En una realización, el material de intercambio catiónico de la membrana es una membrana basado en polietersulfona o una membrana basado en celulosa regenerada modificado con grupos de ácido sulfónico o grupos carboximetilo. En una realización adicional, el paso cromatográfico es una cromatografía en columna o una cromatografía de casete.

65 Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, el verdadero alcance de la cual se expone en las reivindicaciones anexadas.

## Descripción de las figuras

Figura 1: Diagrama de purificación en modo de flujo continuo de mAb IL13 con una membrana Mustang™ S.

Figura 2: a) análisis SEC (cromatograma de exclusión por tamaño) del material de muestra mAb IL13; b) análisis SEC de la fracción 2 del flujo continuo.

Figura 3: análisis SEC de la fracción 2 del flujo continuo de un proceso de membrana Sartobind™ C del material de muestra que contiene el mAb IL13.

Figura 4: análisis SEC de la fracción 4 del flujo continuo de un proceso de membrana Sartobind™ C del material de muestra que contiene el mAb Her2.

**Ejemplos**

## Materiales y métodos:

## Acondicionado del eluato de proteína A:

Un anticuerpo anti-(IL-13R $\alpha$ 1) (denominado en lo sucesivo mAb IL13, véase por ejemplo el documento WO 2006 / 072564) y un anticuerpo anti-HER2 (denominado en lo sucesivo mAb Her2, ver por ejemplo, US 5.677.171) se purificaron en un primer paso con una cromatografía de afinidad de proteína A.

El mAb IL13 se eluyó de la columna de proteína A bajo condiciones ácidas (ácido clorhídrico 3,5 mM, valor de pH  $2,7 \pm 0,2$ ). Antes del paso de filtración, el valor de pH de la fracción que contiene la inmunoglobulina se ajustó con una solución tampón concentrada, por ejemplo, 1 M, a pH 9,0 (por ejemplo, tampón tris (hidroximetil) aminometano (TRIS) o tampón fosfato) a pH 5,0. A partir de ahora este material se refiere como eluato de proteína A acondicionado de mAb IL13.

El mAb Her2 se purificó en un primer paso con una cromatografía de afinidad de proteína A. La elución de la columna de proteína A se lleva a cabo bajo condiciones ácidas (tampón de citrato de sodio 10 mM, valor de pH de  $3,0 \pm 0,5$ ). Antes del paso de filtración, el valor de pH de la fracción que contiene la inmunoglobulina se ajusta con un tampón concentrado de tris (hidroximetil) aminometano (TRIS) a pH 5,6. A partir de ahora este material se refiere como eluato de proteína A acondicionado de mAb Her2.

## Métodos analíticos:

## Cromatografía de exclusión por tamaño:

resina: TSK 3000 (Tosohaas)

columna: 300 x 7,8 mm

tasa de flujo: 0,5 ml / min

tampón: fosfato de potasio 200 mM que contiene cloruro de potasio 250 mM, ajustado a pH 7,0

Longitud de onda: 280 nm

sistema umbral de DNA: véase, por ejemplo Merrick, H., y Hawlitschek, G., Biotech Forum Europe 9 (1992) 398-403

## ELISA de Proteína A:

Los pocillos de una placa microtitulada se revisten con un anticuerpo IgG policlonal anti-proteína A derivado de pollo. Después de la unión, el anticuerpo que no ha reaccionado se elimina por lavado con tampón de muestra. Para la unión de proteína A se añadió un volumen de muestra definido a los pocillos. La proteína A presente en la muestra se une por el anticuerpo de pollo y se retiene en los pocillos de la placa. Después de la incubación se elimina la solución de muestra y los pocillos se lavan. Para la detección se añaden posteriormente un anticuerpo IgG policlonal anti-proteína A derivado de pollo conjugado con biotina y una peroxidasa conjugada con estreptavidina. Después de un paso de lavado se añade una solución de sustrato que resulta en la formación de un producto de reacción coloreado. La intensidad del color es proporcional al contenido de proteína A de la muestra. Después de un tiempo definido se detiene la reacción y se mide la absorbancia.

ELISA de proteína de células huésped (HCP): Las paredes de los pocillos de una placa microtitulada se recubren con una mezcla de albúmina de suero y estreptavidina. Un anticuerpo policlonal derivado de cabra contra HCP se une a las paredes de los pocillos de la placa de microtitulación. Después de un paso de lavado diferentes pocillos de la placa de microtitulación se incubaron con una secuencia de calibración de HCP de diferentes concentraciones y soluciones de muestra. Después de la incubación el material de muestra no unido se elimina mediante lavado con solución tampón. Para la detección, los pocillos se incuban con un conjugado de anticuerpo con peroxidasa para detectar la

proteína de célula huésped unida. La actividad de la peroxidasa fijada se detecta por incubación con ABTS y detección a 405 nm.

Ejemplo 1

5 Purificación de mAb IL13 en forma monomérica-comparación de las condiciones

En la purificación de mAb IL13 en forma monomérica se evaluaron diferentes condiciones.

10 El método de purificación se operó como un método de purificación cromatográfico en el modo de flujo continuo. Se evaluaron diferentes condiciones para la purificación de flujo continuo del mAb IL13. Se utilizó como material de membrana de intercambio catiónico el sistema Mustang™ S-Adsorber (Mustang™ S Coin, 1,5 cm<sup>2</sup> de membrana, Pall Corporation, EE.UU.).

15 El eluato de proteína A acondicionado tenía una concentración de mAb IL13 de 7,1 g / l, con un 90,9% de inmunoglobulina en forma monomérica y el 9,1 % de inmunoglobulina en forma agregada. El eluato de proteína A acondicionado se inactivó de virus y se filtró a través de un filtro de poros de 0,2 μm antes de los experimentos. Después de la dilución con el tampón correspondiente a una concentración de proteína de aprox. 1 mg / ml (una proporción de aprox. 1:7 (v / v)), ajuste de pH y conductividad, las soluciones se aplicaron al material de membrana de intercambio catiónico. Si es necesario el ajuste de pH se realiza con hidrógeno fosfato de potasio o dihidrogenofosfato de potasio y el ajuste de la conductividad se realiza por la adición de KCl o agua desionizada (con pH de aprox. 5,5 y 7,5, respectivamente). Dicho eluato de proteína A diluido, ajustado, y acondicionado se hace referencia a partir de ahora como material de muestra.

25 Los parámetros diversificados fueron la conductividad y el pH. Los parámetros observados fueron el rendimiento y la pureza de la inmunoglobulina de flujo continuo en forma monomérica del material de muestra. Los parámetros diversificados de material de la muestra se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Parámetros de material de la muestra

Nº de muestra	Valor de pH	tampón	conductividad [mS / cm]
1	5,5	fosfato de potasio 40 mM	4,8
2	6,5	fosfato de potasio 40 mM	4,8
3	7,5	fosfato de potasio 40 mM	4,8
4	5,5	fosfato de potasio 50 mM	5,8
5	6,5	fosfato de potasio 50 mM	5,8
6	7,5	fosfato de potasio 50 mM	5,8
7	5,5	fosfato de potasio 60 mM	6,8
8	6,5	fosfato de potasio 60 mM	6,8
9	7,5	fosfato de potasio 60 mM	6,8

30 El flujo continuo ha sido analizado por cromatografía de exclusión por tamaño con el fin de determinar la cantidad de inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada. La segunda fracción se escogió para el análisis porque en el comienzo del proceso (primera fracción) no se había establecido ningún proceso de purificación estable ya que debido al volumen muerto del sistema cromatográfico no existe ningún flujo constante y por lo tanto se produce una dilución desconocido de la primera fracción. Un diagrama de flujo continuo a modo de ejemplo se representa en la Figura 1. Los resultados se resumen en la Tabla 2. Los cromatogramas de exclusión por tamaño del material de la muestra y de la fracción 2 (pH 6,5, 5,8 mS / cm) se muestran en las figuras 2a) y 2b).

Tabla 2: inmunoglobulina mAb IL13 en forma monomérica (como porcentaje de área de la cromatografía SEC) y rendimiento con una membrana Mustang™ S.

valor de pH →	5,5		6,5		7,5	
Conductividad [mS / cm] ↓	rendimiento de la forma monomérica de mAb IL13		rendimiento de la forma monomérica de mAb IL13		rendimiento de la forma monomérica de mAb IL13	
4,8	100 %	33,6 %	100 %	82,5 %	75 %	94,4 %
5,8	100 %	65,7 %	100 %	90,9 %	0 %	100 %
6,8	100 %	67,9 %	99 %	91,1 %	0 %	-

45 Los datos que se presentan en la Tabla 2 muestran que las condiciones adecuadas para la purificación de mAb IL13, es decir, la separación de una inmunoglobulina en forma monomérica de la forma agregada, es decir, condiciones en las que la inmunoglobulina en forma monomérica no se une al material de membrana de intercambio catiónico, con un excelente rendimiento se puede ajustar, como por ejemplo una conductividad de 5,8 mS / cm y un pH de 6,5.

Ejemplo 2

Purificación de mAb IL13 en forma monomérica-comparación de membranas

Los resultados obtenidos en el Ejemplo 1 son de aplicación general y se han aplicado al material de membrana de intercambio catiónico Sartobind™ S (75 cm<sup>2</sup> de área de membrana, Sartorius AG, Göttingen, Alemania). Las condiciones preferidas para Mustang™ S, es decir, conductividad de 5,8 mS / cm a un pH de 6,5, también se aplicaron al material Sartobind™. El material de la muestra que contiene el mAb IL13 tenía una concentración de proteína de 1,34 mg / ml con un 94,8 % de la inmunoglobulina en forma monomérica y un 5,2 % de la inmunoglobulina en forma agregada. El material de la muestra se aplicó a la membrana como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados del proceso de purificación se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Inmunoglobulina mAb IL13 en forma monomérica y agregada (como porcentaje de área de la cromatografía SEC) y rendimiento con una membrana Sartobind™ S.

Nº de muestra	Cantidad de muestra de mAb IL13	Volumen de la muestra	mAb IL13 en forma monomérica en flujo continuo				mAb IL13 en forma agregada en el flujo continuo	
			concentración total	porcentaje de área	cantidad	rendimiento	cantidad	porcentaje de área
1	14,71 mg	11 ml	0,029 mg / ml	100 %	1,02 mg	6,9 %	bdl	-
2	14,71 mg	11 ml	0,51 mg / ml	99 %	5,59 mg	38,0 %	1,00 %	0,06 mg
3	14,71 mg	11 ml	0,89 mg / ml	97,6 %	9,54 mg	64,9 %	2,45 %	0,24 mg
4	14,71 mg	11 ml	0,94 mg / ml	97,5 %	10,03 mg	68,2 %	2,53 %	0,26 mg
5	14,71 mg	11 ml	0,94 mg / ml	97,8 %	10,11 mg	68,7 %	2,17 %	0,22 mg
6	14,71 mg	11 ml	0,94 mg / ml	97,9 %	10,16 mg	69,1 %	2,07 %	0,22 mg
7	14,71 mg	11 ml	0,95 mg / ml	97,5 %	10,14 mg	68,9 %	2,54 %	0,26 mg
Media de las muestras 4 a 7	14,71 mg	11 ml	0,94 mg / ml	97,7 %	10,11 mg	68,7 %	2,33 %	0,24 mg

bdl = por debajo del límite de detección

El mismo material de muestra también se aplicó a una membrana Sartobind™ C. Los resultados se presentan en la Tabla 4 y un ejemplo de cromatograma de exclusión de tamaño de la tercera fracción se muestra en la Figura 3.

Tabla 4: inmunoglobulina mAb IL13 en forma monomérica y agregada (como porcentaje de área de la cromatografía SEC) y rendimiento con una membrana Sartobind™ C.

Nº de muestra	Cantidad de muestra de mAb IL13	Volumen de la muestra	mAb IL13 en forma monomérica en flujo continuo				mAb IL13 en forma agregada en el flujo continuo	
			concentración total	porcentaje de área	cantidad	rendimiento	cantidad	porcentaje de área
1	14,71 mg	11 ml	0 mg / ml	bdl	-	-	bdl	-
2	14,71 mg	11 ml	0,033 mg / ml	100 %	0,36 mg	2,4 %	bdl	-
3	14,71 mg	11 ml	0,56 mg / ml	100 %	6,15 mg	41,8 %	bdl	-
4	14,71 mg	11 ml	0,87 mg / ml	99,4 %	9,54 mg	64,9 %	0,65 %	0,06 mg
5	14,71 mg	11 ml	0,93 mg / ml	99,3 %	10,20 mg	69,3 %	0,66 %	0,07 mg
6	14,71 mg	11 ml	0,96 mg / ml	98,9 %	10,43 mg	70,9 %	1,13 %	0,12 mg
7	14,71 mg	11 ml	0,98 mg / ml	98,9 %	10,66 mg	72,5 %	1,08 %	0,12 mg
media de muestras de 4 a 7	14,71 mg	11 ml	0,94 mg / ml	99,1 %	10,21 mg	69,4 %	0,88 %	0,09 mg

bdl = por debajo del límite de detección  
- = no determinado

Mediante el uso de las condiciones de purificación determinadas con un material de membrana en todos los experimentos, todos los adsorbentes de membrana catiónica demostraron tener la capacidad de eliminar los agregados y obtener IgG monomérico en el modo de medición de flujo continuo con las mismas condiciones.

5 Ejemplo 3

Purificación de mAb Her2 en forma monomérica-comparación de membranas

10 El eluato de proteína A acondicionado poseía una concentración de mAb Her2 de 7,61 g / l, con un 98,8 % de pureza. La inmunoglobulina en forma agregada se produjo / obtuvo mediante calentamiento de la solución de mAb Her2 a 37 °C durante 3 días. La solución contenía después del tratamiento térmico un 99,0 % de la inmunoglobulina en forma monomérica y un 1,0 % de la inmunoglobulina en forma agregada sin considerar las sustancias de bajo peso molecular presentes en la muestra tratada con calor. El eluato de proteína A acondicionado se inactivó de virus y se filtró a través de un filtro de tamaño de poro de 0,2 µm antes de los experimentos. Después de diluir a una concentración de proteína de 1,03 mg / ml, ajuste del pH y la conductividad, la solución se aplicó a los materiales de membrana de intercambio de cationes Sartobind™ S y C, respectivamente. El ajuste de la conductividad se realizó mediante la adición de NaCl (5 mol / l). Los resultados se muestran en las Tablas 5 y 6.

20 Tabla 5: inmunoglobulina mAb Her2 en forma monomérica y agregada (como porcentaje de área de cromatografía SEC) y rendimiento con una membrana Sartobind™ S.

Nº de muestra	Cantidad de muestra de mAb Her2	Volumen de la muestra	mAb Her2 en forma monomérica en flujo continuo				mAb Her2 en forma agregada en el flujo continuo	
			concentración total	porcentaje de área	cantidad	rendimiento	cantidad	porcentaje de área
1	11,35 mg	11 ml	0,053 mg / ml	40,4 %	0,23 mg	0,02 %	bdl	-
2	11,35 mg	11 ml	0,600 mg / ml	99,2 %	6,47 mg	57,0 %	bdl	-
3	11,35 mg	11 ml	0,908 mg / ml	99,8 %	9,86 mg	86,9 %	0,02 %	0,002 mg
4	11,35 mg	11 ml	0,977 mg / ml	99,9 %	10,60 mg	93,4 %	0,03 %	0,003 mg
5	11,35 mg	11 ml	0,999 mg / ml	99,8 %	10,83 mg	95,4 %	bdl	-
6	11,35 mg	11 ml	1,013 mg / ml	99,9 %	10,99 mg	96,8 %	bdl	-
7	11,35 mg	11 ml	1,019 mg / ml	99,8 %	10,04 mg	88,5 %	0,05 %	0,006 mg
8	11,35 mg	11 ml	1,023 mg / ml	99,9 %	11,10 mg	97,8 %	0,08 %	0,009 mg
9	11,35 mg	11 ml	1,025 mg / ml	99,8 %	11,12 mg	98,0 %	0,14 %	0,016 mg
10	11,35 mg	11 ml	1,024 mg / ml	99,8 %	11,11 mg	97,9 %	0,17 %	0,019 mg
11	11,35 mg	11 ml	1,025 mg / ml	99,7 %	11,11 mg	97,9 %	0,18 %	0,020 mg
12	11,35 mg	11 ml	1,027 mg / ml	99,7 %	11,13 mg	98,1 %	0,23 %	0,026 mg
13	11,35 mg	11 ml	1,028 mg / ml	99,7 %	11,13 mg	98,1 %	0,24 %	0,027 mg
14	11,35 mg	11 ml	1,028 mg / ml	99,6 %	11,13 mg	98,1 %	0,30 %	0,034 mg
15	11,35 mg	11 ml	1,027 mg / ml	99,6 %	11,30 mg	99,6 %	0,32 %	0,036 mg
promedio de las muestras 4 a 15	11,35 mg	11 ml	1,018 mg / ml	99,8 %	10,97 mg	96,7 %	0,14 %	0,016 mg

bdl = por debajo del límite de detección  
- = no determinado

Tabla 6: inmunoglobulina mAb Her2 en forma monomérica y agregada (como porcentaje de área de cromatografía SEC) y rendimiento con una membrana Sartobind™ C.

Nº de muestra	Cantidad de muestra de mAb Her2	Volumen de la muestra	mAb Her2 en forma monomérica en flujo continuo				mAb Her2 en forma agregada en el flujo continuo	
			concentración total	porcentaje de área	cantidad	rendimiento	cantidad	porcentaje de área
1	11,35 mg	11 ml	0,082 mg / ml	74,8 %	0,67 mg	5,9 %	bdl	-
2	11,35 mg	11 ml	0,656 mg / ml	99,1 %	7,07 mg	62,3 %	bdl	-
3	11,35 mg	11 ml	0,861 mg / ml	99,7 %	9,32 mg	82,1 %	bdl	-
4	11,35 mg	11 ml	0,929 mg / ml	99,7 %	10,06 mg	88,6 %	0,04 %	0,004 mg
5	11,35 mg	11 ml	0,965 mg / ml	99,7 %	10,45 mg	92,1 %	0,09 %	0,01 mg
6	11,35 mg	11 ml	0,992 mg / ml	99,7 %	10,47 mg	92,2 %	0,15 %	0,015 mg
7	11,35 mg	11 ml	1,004 mg / ml	99,8 %	10,88 mg	95,9 %	0,14 %	0,015 mg
8	11,35 mg	11 ml	1,014 mg / ml	99,7 %	10,98 mg	96,7 %	0,24 %	0,027 mg
9	11,35 mg	11 ml	1,015 mg / ml	99,7 %	10,99 mg	96,8 %	0,29 %	0,032 mg
10	11,35 mg	11 ml	1,017 mg / ml	99,6 %	11,00 mg	96,9 %	0,36 %	0,04 mg
11	11,35 mg	11 ml	1,019 mg / ml	99,6 %	11,03 mg	97,2 %	0,43 %	0,047 mg
12	11,35 mg	11 ml	1,021 mg / ml	99,5 %	11,04 mg	97,3 %	0,41 %	0,046 mg
13	11,35 mg	11 ml	1,022 mg / ml	99,5 %	11,05 mg	97,4 %	0,42 %	0,047 mg
14	11,35 mg	11 ml	1,024 mg / ml	99,5 %	11,07 mg	97,5 %	0,51 %	0,055 mg
15	11,35 mg	11 ml	1,024 mg / ml	99,5 %	11,07 mg	97,5 %	0,47 %	0,051 mg

## ES 2 449 148 T3

Promedio de las muestras 4 a 15	11,35 mg	11 ml	1,0 mg / ml	99,6 %	10,84 mg	95,5 %	0,30 %	0,032 mg
BDL = por debajo del límite de detección - = no determinado								

Se muestra a modo de ejemplo un análisis de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de la fracción 4 del flujo continuo de una membrana Sartobind™ C en la Figura 4.

- 5 Se puede resumir de lo anterior que la suma del valor de pH y la conductividad en mS / cm está preferiblemente en el intervalo de 9 a 18, más preferiblemente en el intervalo de 10 a 15.

### Ejemplo 4

- 10 Análisis del contenido de proteína A, DNA y HCP.

Las fracciones obtenidas en el Ejemplo 2 se han analizado para el contenido de proteína A, DNA, y HCP. Los resultados se proporcionan en las Tablas 7 y 8.

- 15 El contenido de proteína A en la solución antes de la aplicación a la membrana Sartobind™ S fue de 2,6 ng / ml, el contenido de DNA fue < 0,3 pg / mg, y el contenido de proteína de célula huésped (HCP) fue de 1791 ng / mg.

- 20 Tabla 7: Contenido de Proteína A, DNA, y HCP de las fracciones que contienen inmunoglobulina mAb IL13 obtenida con una membrana Sartobind™ S.

N <sup>o</sup> de muestra	volumen [ml]	Concentración de proteína [mg / ml]	Proteína A [ng / mg]	DNA [pg / mg]	HCP [ng / mg]
1	11	0,029	< 4,1	< 13,8	28
2	11	0,513	0,5	< 0,8	< 118
3	11	0,889	< 0,3	< 0,4	< 202
4	11	0,935	0,7	< 0,4	255
5	11	0,939	-	< 0,4	-
6	11	0,943	-	< 0,4	-
- = no determinado					

El contenido de proteína A en la solución antes de la aplicación a la membrana Sartobind™ C fue de 3,0 ng / ml, el contenido de DNA fue < 0,4 pg / mg, y el contenido de proteína de célula huésped (HCP) fue de 5250 ng / mg.

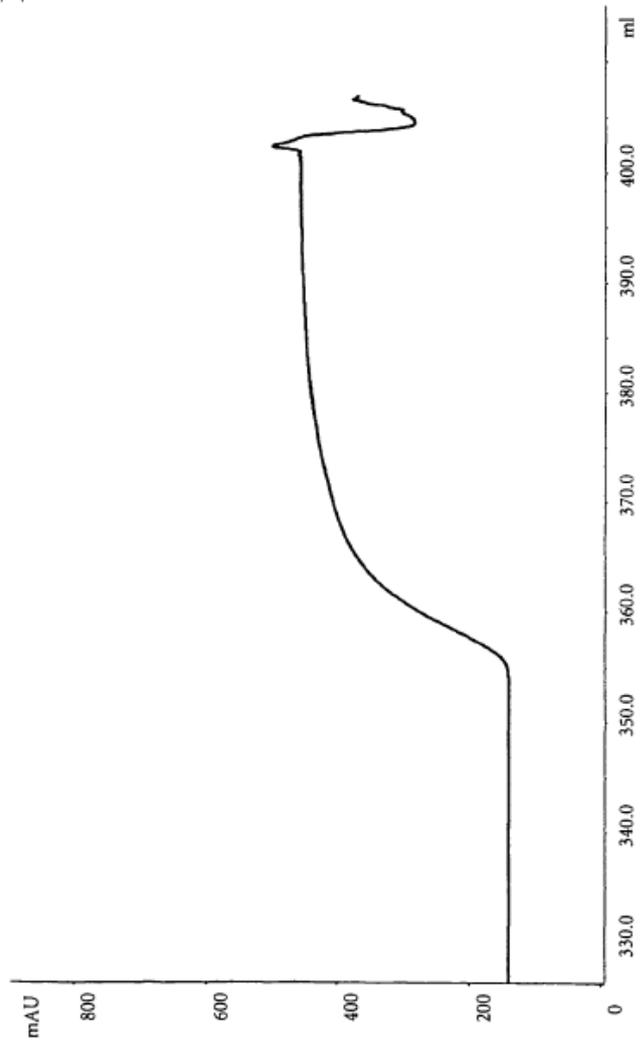
- 25 Tabla 8: Contenido de Proteína A, DNA, y HCP de las fracciones que contienen inmunoglobulina mAb IL13 obtenida con una membrana Sartobind™ C.

N <sup>o</sup> de muestra	volumen [ml]	Concentración de proteína [mg / ml]	Proteína A [ng / mg]	DNA [pg / mg]	HCP [ng / mg]
1	11	0,033	< 4,2	< 13,3	155
2	11	0,559	< 0,2	< 0,7	1036
3	11	0,873	0,3	< 0,5	989
4	11	0,933	0,7	< 0,4	1366
5	11	0,959	n.b.	n.b.	n.b.
6	11	0,979	n.b.	n.b.	n.b.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para la obtención de una inmunoglobulina en forma monomérica a partir de una solución que comprende la inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada, que se caracteriza porque dicho método comprende el siguiente paso:
- 10 a) aplicar una solución acuosa, tamponada que comprende dicha inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada a un material de membrana de intercambio catiónico bajo condiciones en donde al menos el 90 % de dicha inmunoglobulina en forma monomérica no se une a dicho material de membrana de intercambio de cationes, y recuperar dicha inmunoglobulina en forma monomérica a partir de dicha solución acuosa, tamponada después de contactar con dicho material de membrana de intercambio catiónico,
- 15 por lo que dicho paso a) es un paso cromatográfico que opera en modo de flujo continuo y dicha solución acuosa, tamponada tiene un valor de pH desde pH 4 a pH 8 y dicha solución acuosa, tamponada del paso a) tiene una conductividad de 1,0 a 15,0 mS / cm y la suma del valor de pH y de la conductividad en mS / cm de la solución acuosa, tamponada en el paso a) está en el intervalo de 10 a 15.
- 20 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza porque dicho material de la membrana de intercambio de cationes es una membrana basada en polietersulfona o una membrana basada en celulosa regenerada modificada con grupos de ácido sulfónico o grupos carboximetilo.
- 25 3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque dicha solución acuosa, tamponada del paso a) tiene un valor de pH entre pH 5 y pH 8.
- 30 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque dicha solución acuosa, tamponada del paso a) tiene una conductividad de 4,0 a 10,0 mS / cm.
- 35 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque dicha recuperación de dicha inmunoglobulina en forma monomérica del flujo continuo es mediante un método seleccionado a partir de la precipitación, desplazamiento salino, ultrafiltración, diafiltración, liofilización, cromatografía de afinidad, o reducción de volumen de disolvente para obtener una solución concentrada.
- 40 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, que se caracteriza porque dicha recuperación es por ultrafiltración, liofilización, o reducción de volumen de disolvente.
- 45 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque dicha inmunoglobulina obtenida del flujo continuo del material de la membrana de intercambio catiónico al menos un 95 % de la inmunoglobulina está en forma monomérica.
8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque dicha solución acuosa, tamponada es una solución que comprende ácido fosfórico o sales del mismo, ácido cítrico o sales del mismo, o histidina o sales de la misma.
9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque dicha solución acuosa, tamponada comprende cloruro de sodio o cloruro de potasio.
10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque dicho paso cromatográfico es una cromatografía en columna o una cromatografía de casete.

Fig. 1



**Fig. 2a**

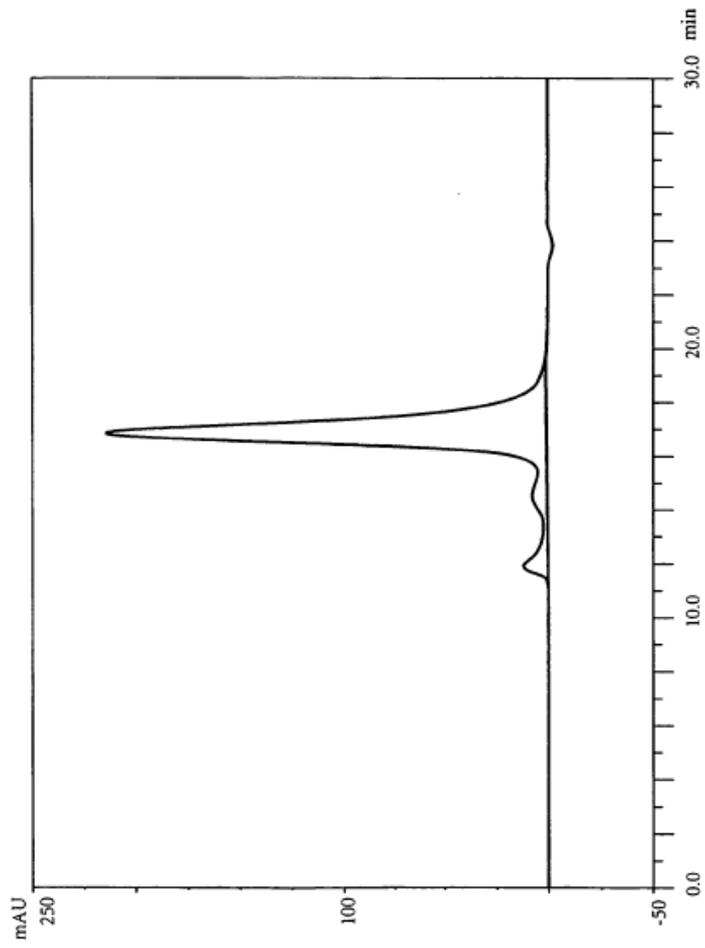


Fig. 2b)

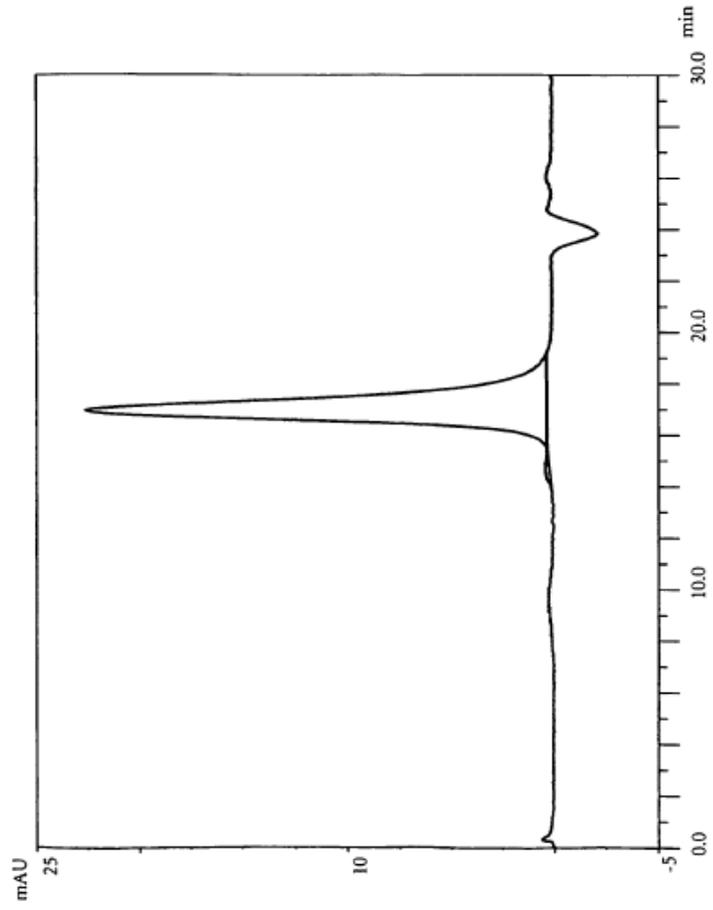
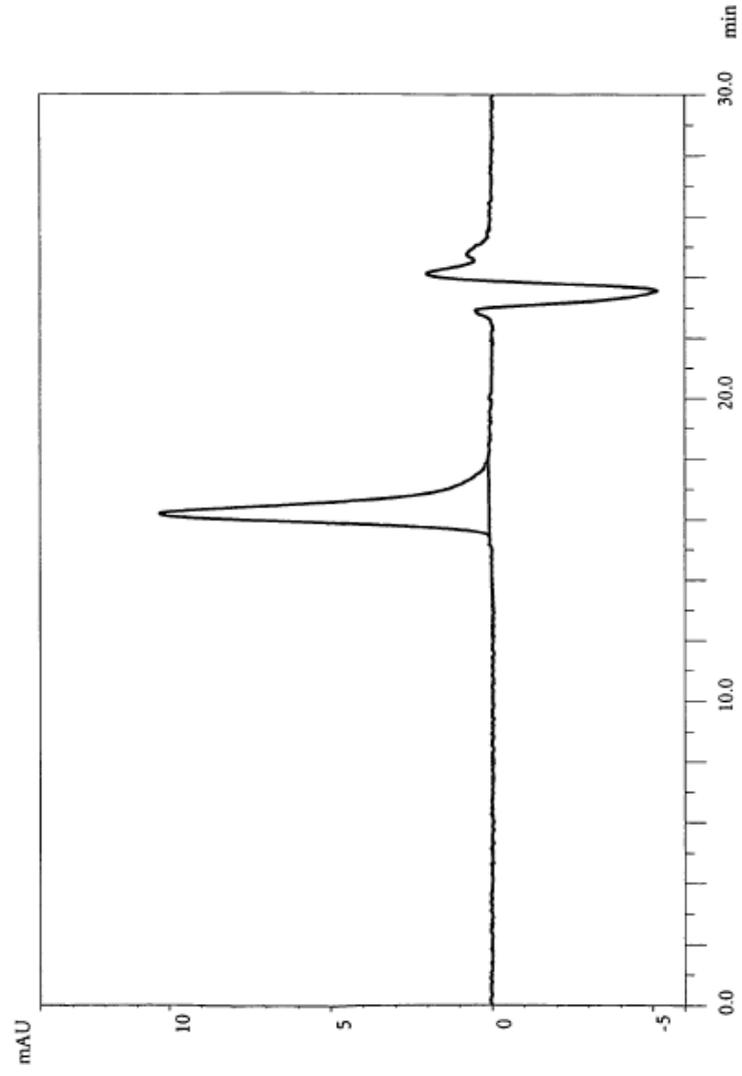


Fig. 3



**Fig. 4**

