

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 542**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/06** (2006.01)

**C07K 1/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2009 E 09796320 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2379108**

54 Título: **Purificación de inmunoglobulinas**

30 Prioridad:

**22.12.2008 EP 08022236**

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

**27.08.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**POMPIATI, MARC y  
SCHAUBMAR, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 488 542 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 se encuentra en el campo de la purificación de polipéptidos. Se informa de un método para proporcionar una inmunoglobulina en forma monomérica mediante la separación de la inmunoglobulina en solución de las impurezas, especialmente de la inmunoglobulina en forma agregada y de los fragmentos de inmunoglobulina.

Antecedentes de la invención

10 Las proteínas y especialmente las inmunoglobulinas desempeñan un papel importante en la cartera médica actual. Para la aplicación en el ser humano toda proteína terapéutica debe cumplir unos claros criterios. Para garantizar la seguridad de los agentes biofarmacéuticos para el ser humano, deben eliminarse especialmente los ácidos nucleicos, virus y proteínas de célula huésped, que podrían resultar perjudiciales. Para cumplir las especificaciones legales deben realizarse una o más etapas de purificación después del procedimiento de fermentación. Entre otras cosas, la pureza, la cantidad producida y el rendimiento desempeñan un papel importante en la determinación del procedimiento de purificación apropiado.

15 Una serie de diferentes métodos se encuentran bien establecidos y son ampliamente utilizados para la purificación de proteínas, tales como la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo la cromatografía de afinidad de proteína A o de proteína G), la cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo de intercambio catiónico (por ejemplo de intercambio catiónico (resinas sulfopropilo o carboximetilo), de intercambio aniónico (resinas aminoetilo) y de intercambio de modo mixto), la adsorción tiofílica (por ejemplo con beta-mercaptoetanol y con otros ligandos de SH), la cromatografía de interacción hidrofóbica o de adsorción aromática (por ejemplo con fenilsefariosa, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), la cromatografía de afinidad de quelato metálico (por ejemplo con material de afinidad por el Ni(II) y por el Cu(II)), la cromatografía de exclusión por tamaño, y métodos electroforéticos (tales como la electroforesis en gel y la electroforesis capilar) (ver, por ejemplo, Vijayalakshmi M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75:93-102, 1998).

20 Necina R. *et al.* (Biotechnol. Bioeng. 60:689-698,1998) han informado de la captura de anticuerpos monoclonales humanos directamente de los sobrenadantes de cultivo celular mediante medios de intercambio iónico que muestran una densidad de carga elevada. En el documento nº WO 89/05157 se informa de un método para la purificación de inmunoglobulinas de producto sometiendo directamente el medio de cultivo celular a un tratamiento de intercambio catiónico. Se describe una purificación en una etapa de anticuerpos IgG monoclonales a partir de ascites de ratón en Danielsson A. *et al.*, J. Immunol. Meth. 115:79-88, 1988.

25 Mhatre R. *et al.*, J. Chrom. A 707:225-231, 1995, han explorado la purificación de fragmentos Fab de anticuerpo mediante cromatografía de intercambio catiónico y elución de gradiente de pH. El documento nº WO 94/00561 informa de anticuerpos monoclonales anti-rhesus humanos y líneas celulares productoras de los mismos. Un método para purificar un polipéptido mediante cromatografía de intercambio iónico se informa en el documento nº WO 2004/024866 en el que se utiliza un lavado en gradiente para resolver un polipéptido de interés de uno o más contaminantes. Schwarz A. *et al.*, Laborpraxis 21:62-66, 1997, informan de la purificación de anticuerpos monoclonales con una columna CM-HyperD. El documento nº WO 2004/076485 informa de un procedimiento para la purificación de anticuerpos mediante cromatografía de proteína A y de intercambio iónico. En la patente EP nº 0 530 447 se informa de un procedimiento para purificar anticuerpos IgG monoclonales mediante una combinación de tres etapas cromatográficas. La eliminación de la proteína A de las preparaciones de anticuerpos se informa en la patente US nº 4.983.722.

30 Los procedimientos de anticuerpos monoclonales recombinantes con frecuencia utilizan la cromatografía de intercambio aniónico para unir niveles traza de impurezas y contaminantes potenciales, tales como ADN, proteínas de las células huésped y virus, permitiendo simultáneamente la elución del anticuerpo (Knudsen H.L. *et al.*, J. Chrom. A907:145-154, 2001).

35 El documento nº WO 95/16037 informa de la purificación de anticuerpos monoclonales biespecíficos anti-EGF-R/anti-CD3 de hibridoma híbrido realizada mediante cromatografía de proteína A y de intercambio catiónico. La separación de monómeros de anticuerpo de sus multímeros mediante la utilización de cromatografía de intercambio iónico se informa en la patente EP nº 1 084 136. La patente US nº 5.429.746 se refiere a la aplicación de cromatografía de interacción hidrofóbica de combinación a la purificación de moléculas de proteína anticuerpo. Una membrana microporosa modificada aniónica para la utilización en la filtración de fluidos, en particular líquidos parenterales o biológicos contaminados con partículas cargadas, se informa en la patente US nº 4.604.208. El documento nº WO 03/040166 informa de una membrana y un dispositivo diseñado para la eliminación de impurezas traza en flujos que contienen proteínas.

Se informa de un método para recuperar un polipéptido en la patente US nº 6.716.598. En el documento nº US 2006/0194953 se informa de un método para eliminar selectivamente fugas de proteína A respecto de anticuerpos purificados mediante cromatografía de afinidad de proteína A. La separación de proteínas monoméricas respecto de agregados mediante la utilización de cromatografía de intercambio iónico se informa en el documento nº WO 99/62936. Lynch P. y Londo T., Gen. Eng. News 11:17, 1997 informan de un sistema para la eliminación de agregados de anticuerpos de grado terapéutico purificados por afinidad. Se informa de una purificación en dos etapas de un anticuerpo monoclonal murino destinado a la aplicación terapéutica en Jiskoot W. *et al.*, J. Immunol. Meth. 124:143-156, 1989.

En el documento nº WO 99/62936 se informa de la separación de proteínas monoméricas respecto de agregados mediante la utilización de cromatografía de intercambio iónico en modo unión/elución. Se informa de un sistema para la eliminación de agregados de anticuerpos de grado terapéutico purificados por afinidad en Lynch P. *et al.* (Genetic Engineering News, Mary Ann Libert, New York, página 17, 1997). Jiskoot W. *et al.* informan de una purificación en dos etapas de un anticuerpo monoclonal murino destinado a la aplicación terapéutica en el hombre, optimización de las condiciones de purificación e incremento progresivo (J. Immunol. Meth. 124:143-156, 1989).

#### Descripción resumida de la invención

La presente invención comprende aspectos en el campo de la purificación de inmunoglobulinas. Se ha encontrado que una etapa de cromatografía de intercambio aniónico en la que puede obtenerse la inmunoglobulina en forma monomérica a partir de un material de intercambio aniónico en un modo elución debe llevarse a cabo en un intervalo estrecho de valores de pH, de entre pH 8,0 y pH 8,5. Inesperadamente, una pequeña desviación respecto de dicho intervalo de valores de pH, por ejemplo a pH 7,0 ó a pH 9,0, anula dicho efecto. Con el método según la invención resulta posible separar en una única etapa la inmunoglobulina en forma monomérica de la inmunoglobulina en forma agregada y de los fragmentos de inmunoglobulina.

Un aspecto es un método para obtener una inmunoglobulina en forma monomérica, en el que el método comprende la etapa siguiente:

aplicar una solución acuosa tamponada que comprende una inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada y/o fragmentos de inmunoglobulina a un material cromatográfico de intercambio aniónico,

en el que la inmunoglobulina eliminada de agregados de inmunoglobulina y de fragmentos de inmunoglobulina se recupera del eluido o del sobrenadante del material de cromatografía de intercambio aniónico, en el que la solución acuosa tamponada presenta un valor de pH de entre pH 8,0 y pH 8,5, y de esta manera se obtiene una inmunoglobulina en forma monomérica. En otra realización, el material de cromatografía de intercambio aniónico es un material de cromatografía de intercambio aniónico de membrana. En una realización adicional, el material de cromatografía de intercambio aniónico es un material de cromatografía de intercambio aniónico fuerte que presenta un grupo de amonio cuaternario como sustituyente cargado. En otra realización, el material de cromatografía de intercambio aniónico fuerte es Q-sefarosa<sup>®</sup>, es decir, una matriz de agarosa entrecruzada (R) al que se unen covalentemente grupos de amonio cuaternario de fórmula R-O-CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. En todavía otra realización, el método comprende como primera etapa una etapa adicional de cromatografía de proteína A o una etapa adicional de cromatografía hidrofóbica de inducción de carga (CHIC) o una etapa adicional de cromatografía de intercambio iónico.

#### Descripción detallada de la invención

La expresión "material de intercambio iónico" o equivalentes gramaticales de la misma se refiere a una matriz inmóvil que porta sustituyentes cargados y unidos covalentemente. Para una neutralidad de carga global, se unen los contraiones no unidos covalentemente a los sustituyentes cargados mediante interacción iónica. El "material de intercambio iónico" presenta la capacidad de intercambiar sus contraiones no unidos covalentemente por parejas de unión o iones de carga similar de la solución circundante. Dependiendo de la carga de sus contraiones intercambiables, el "material de intercambio iónico" se denomina "material de intercambio catiónico" o "material de intercambio aniónico". Dependiendo de la naturaleza del grupo (sustituyente) cargado, el "material de intercambio iónico" se denomina, por ejemplo en el caso de materiales de intercambio catiónico, resina ácido sulfónico o sulfopropilo (S) o resina carboximetilo (CM). Dependiendo de la naturaleza química del grupo/sustituyente cargado, el "material de intercambio iónico" puede clasificarse adicionalmente como material de intercambio iónico fuerte o débil, según la fuerza del sustituyente cargado y unido covalentemente. Por ejemplo, los materiales de intercambio catiónico fuerte presentan un grupo ácido sulfónico, preferentemente un grupo sulfopropilo, como sustituyente cargado, los materiales de intercambio catiónico débil presentan un grupo ácido carboxílico, preferentemente un grupo carboximetilo, como sustituyente cargado. Los materiales de intercambio aniónico fuerte presentan un grupo de amonio cuaternario, y los materiales de intercambio aniónico presentan un grupo dietilaminoetilo como sustituyente cargado.

El término "membrana" se refiere a una membrana tanto microporosa como macroporosa. La membrana misma está compuesta de un material polimérico, tal como, por ejemplo, polietileno, polipropileno, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, politetrafluoroetileno, policarbonato, cloruro de polivinilo, poliamidas (nilón, por ejemplo Zetapore™, N66 Posidyne™), poliésteres, acetato de celulosa, celulosa regenerada, compuestos de celulosa, polisulfonas, polietersulfonas, poliarilsulfonas, polifenilsulfonas, poliacrilonitrilo, fluoruro de polivinilideno, tejidos no tejidos y tejidos (por ejemplo Tyvek®), material fibroso o de material inorgánico, tal como zeolita, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> o hidroxipatito.

Los materiales de intercambio iónico se encuentran disponibles bajo nombres diferentes y de una multitud de compañías, tales como, por ejemplo, las resinas de intercambio catiónico Bio-Rex® (por ejemplo de tipo 70), Chelex® (por ejemplo de tipo 100), Macro-Prep® (por ejemplo de tipo CM, High S, 25 S), AG® (por ejemplo, de tipo 50W, MP) todos disponibles de BioRad Laboratories, WCX 2 disponible de Ciphergen, Dowex® MAC-3 disponible de la compañía Dow Chemical, celulosa CM (por ejemplo, de tipo 23, 52), hiper-D, partisphere disponible de Whatman plc., Amberlite® IRC (por ejemplo, de tipo 76, 747, 748), Amberlite® GT 73, Toyopearl® (por ejemplo, de tipo SP, CM, 650M) todos disponibles de Tosoh Bioscience GmbH, CM 1500 y CM 3000 disponible de BioChrom Labs, SP-Sepharose™, CM-Sepha-rose™ disponibles de GE Healthcare, resinas Poros disponibles de PerSeptive Biosystems, Asahipak ES (por ejemplo, de tipo 502C), CXpak P, IEC CM (por ejemplo, de tipos 825, 2825, 5025, LG), IEC SP (por ejemplo, de tipos 420N, 825), IEC QA (por ejemplo, de tipo LG, 825) disponible de Shoko America Inc., resina de intercambio catiónico 50W, disponible de Eichrom Technologies Inc., y tales como, por ejemplo, resinas de intercambio aniónico como Dowex® 1, disponible de la compañía Dow Chemical, AG® (por ejemplo, de tipos 1, 2, 4), Bio-Rex® 5, DEAE Bio-Gel 1, Macro-Prep® DEAE, todos disponibles de BioRad Laboratories, resina de intercambio aniónico de tipo 1, disponible de Eichrom Technologies Inc., Source Q, ANX Sepharose® 4, DEAE Sepharose® (por ejemplo, de 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, de tipo 624, G), IEC DEAE, todos disponibles de Shoko America Inc., Amberlite® IRA-96, Toyopearl® DEAE, TSKgel DEAE, todos disponibles de Tosoh Bioscience GmbH, Alemania. Los materiales de intercambio iónico de membrana se encuentran disponibles de diferentes compañías, tales como los materiales de intercambio catiónico de membrana™ C y Mustang™ S, disponibles de Pall Corporation, Sartobind™ CM y Sartobind™ S, disponibles de Sartorius, y las membranas de intercambio aniónico, tales como Mustang™ Q, disponibles de Pall Corporation, Sartobind™ Q, disponibles de Sartorius. En un material de intercambio iónico de membrana, los sitios de unión pueden encontrarse en las paredes de poros de elución y no ocultos dentro de los poros de difusión, permitiendo la transferencia de masa por convección y no por difusión. En una realización, la etapa adicional de cromatografía es una etapa de cromatografía de intercambio catiónico que utiliza un material de intercambio catiónico de membrana seleccionado de entre Sartobind™ CM o Sartobind™ S, o Mustang™ S, o Mustang™ C. En otra realización, el material de intercambio aniónico es un material de intercambio aniónico de membrana de tipo Q o una columna de intercambio aniónico de tipo Q.

Un "polipéptido" es un polímero de residuos aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, producidos naturalmente o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos aminoácidos pueden denominarse "péptidos".

Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas o por lo menos una cadena polipeptídica de más de 100 residuos aminoácidos. Una proteína puede comprender además componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. La célula en la que se produce una proteína puede añadir carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos a la misma y estos variarán según el tipo de célula. Las proteínas se definen en la presente memoria en términos de sus estructuras esqueléticas de aminoácidos; algunas adiciones tales como grupos carbohidrato generalmente no se especifican, aunque pueden encontrarse presentes de todos modos.

El término "inmunoglobulina" y equivalentes gramaticales de la misma se refieren a una molécula que consiste de dos cadenas polipeptídicas ligeras y dos cadenas polipeptídicas pesadas. Cada una de las cadenas polipeptídicas pesada y ligera puede contener una región variable (generalmente la parte amino-terminal de las cadenas polipeptídicas), que contiene un dominio de unión para la interacción con un antígeno. Cada una de las cadenas polipeptídicas pesada y ligera comprende además una región constante (generalmente la parte carboxilo-terminal de las cadenas polipeptídicas), que puede mediar en la unión del anticuerpo a tejido o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmunológico, algunas células fagocíticas y un primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento. En una realización, las cadenas polipeptídicas ligera y pesada son cadenas, consistiendo cada una de ellas de una región variable, es decir V<sub>L</sub> o V<sub>H</sub>, y una región constante, es decir de C<sub>L</sub> en el caso de una cadena polipeptídica ligera, o de C<sub>H1</sub>, bisagra, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> y opcionalmente C<sub>H4</sub> en el caso de una cadena polipeptídica pesada. El término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste de polipéptidos codificados por genes de inmunoglobulina. Entre los genes de inmunoglobulina reconocidos se incluyen los diferentes genes de región constante, así como la multitud de genes de región variable de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden existir en una diversidad de formas. Los fragmentos de inmunoglobulina son, por ejemplo, F<sub>v</sub>, Fab y F(ab)<sub>2</sub>,

así como cadenas individuales (por ejemplo Huston J.S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988; Bird *et al.*, Science 242:423-426, 1988; Hood *et al.*, Immunology, Benjamin N.Y., 2a edición, 1984; y Hunkapiller y Hood, Nature 323:15-16, 1986. En una realización del método según la invención, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina monoclonal.

5 La expresión "inmunoglobulina en forma monomérica" y equivalentes gramaticales de la misma se refieren a una molécula de inmunoglobulina no asociada a una segunda molécula de inmunoglobulina, es decir, no unidos ni covalentemente ni no covalentemente a otra molécula de inmunoglobulina. La expresión "inmunoglobulina en forma agregada" y equivalentes gramaticales de la misma se refieren a una molécula de inmunoglobulina que se encuentra asociada, covalentemente o no covalentemente, a por lo menos una molécula adicional de inmunoglobulina o fragmento de la misma, y que se eluye en una cromatografía con una columna de cromatografía de exclusión por tamaño antes de la inmunoglobulina en forma monomérica. La expresión "en forma monomérica" y equivalentes gramaticales de la misma tal como se utilizan en la presente solicitud no se refieren necesariamente a que 100% de una molécula de inmunoglobulina se encuentra presente en forma monomérica. Se refiere a que una inmunoglobulina se encuentra esencialmente en forma monomérica, es decir, por lo menos 90% de la inmunoglobulina se encuentra en forma monomérica; en una realización, por lo menos 95% de la inmunoglobulina se encuentra en forma monomérica; en otra realización por lo menos 98% de la inmunoglobulina se encuentra en forma monomérica; en una realización adicional, por lo menos 99% de la inmunoglobulina se encuentra en forma monomérica, y en todavía otra realización, más de 99% de la inmunoglobulina se encuentra en forma monomérica, determinada como el área de pico de un cromatograma de exclusión por tamaño de la inmunoglobulina. La expresión "en forma monomérica y en forma agregada/fragmentada" se refiere a una mezcla que comprende por lo menos moléculas de inmunoglobulina no asociadas a otras moléculas de inmunoglobulina, moléculas de inmunoglobulina asociadas a otras moléculas de inmunoglobulina y/o partes de otras moléculas de inmunoglobulina. En dicha mezcla, ni la forma monomérica ni la forma agregada ni la forma fragmentada se encuentra presente de manera exclusiva.

El término "100%" se refiere a que la cantidad de componentes aparte de un componente especificado es inferior al límite de detección al método analítico al que se hace referencia, bajo las condiciones especificadas.

30 Los términos "90%", "95%", "98%" y "99%" se refieren no a valores exactos sino a valores dentro de la precisión del método analítico al que se hace referencia, bajo las condiciones especificadas.

La expresión "inmunoglobulina monomérica purificada de agregados de inmunoglobulina y fragmentos de inmunoglobulina" se refiere a que la inmunoglobulina monomérica constituye en determinadas realizaciones por lo menos 90% en peso, por lo menos 95% en peso, por lo menos 98% en peso o por lo menos 99% en peso. A su vez, los agregados de inmunoglobulina y los fragmentos de inmunoglobulina constituyen, en determinadas realizaciones, no más de 10% en peso, no más de 5% en peso, no más de 2% en peso o no más de 1% en peso de la preparación.

40 Los métodos cromatográficos generales y su utilización son conocidos por el experto en la materia. Ver, por ejemplo, Chromatography, 5a edición, parte A: Fundamentals and Techniques, Heftmann, E. (ed.), Elsevier Science Publishing Company, New 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, New 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, N.Y., 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F. M. *et al.* (editores), John Wiley & Sons, Inc., New York.

50 Para la purificación de inmunoglobulinas producidas recombinantemente, con frecuencia se utiliza una combinación de diferentes etapas cromatográficas. En general tras una cromatografía de afinidad de proteína A se realiza una o dos etapas adicionales de separación. La etapa de purificación final es una denominada "etapa de pulido" para la eliminación de impurezas traza y contaminantes como PCH (proteínas de la célula huésped) residuales, ADN (ácidos nucleicos de la célula huésped), virus o endotoxinas. Para esta etapa de pulido sólo se utiliza ocasionalmente un material de intercambio aniónico en modo elución.

55 La expresión "modo elución" y equivalentes gramaticales de la misma se refiere a un modo de operación de un método de purificación, en el que una solución que contiene una sustancia de interés, por ejemplo una inmunoglobulina en forma monomérica, que debe purificarse se pone en contacto con una fase estacionaria, en una realización una fase sólida, en la que la sustancia de interés no se une a dicha fase estacionaria. En consecuencia, la sustancia de interés se obtiene en el eluido (en el caso de que el método de purificación sea un método cromatográfico) o en el sobrenadante (en el caso de que el método de purificación sea un método por lotes). Las sustancias que no son de interés, por ejemplo una inmunoglobulina en forma agregada y/o fragmentos de inmunoglobulina, que también se encontraban presentes en la solución antes de la puesta en contacto con la fase

estacionaria, se unen a la fase estacionaria y en ella son eliminadas de la solución. Lo anterior no indica que 100% de las sustancias que no son de interés son eliminadas de la solución sino que resultan eliminadas esencialmente 100% de las sustancias que no son de interés; en realizaciones específicas, resultan eliminadas de la solución por lo menos 50% de las sustancias que no son de interés, resultan eliminadas de la solución por lo menos 75% de las sustancias que no son de interés, resultan eliminadas de la solución por lo menos 90% de las sustancias que no son de interés, o resultan eliminadas de la solución más de 95% de las sustancias que no son de interés, según determina el área de pico de una cromatografía de exclusión por tamaño.

La expresión "aplicable a" y equivalentes gramaticales de la misma se refiere a una etapa parcial de un método de purificación, en el que una solución que contiene una sustancia de interés que debe purificarse se pone en contacto con una fase estacionaria. Lo anterior indica que: a) la solución se añade a una dispositivo cromatográfico en el que se encuentra situada la fase estacionaria, o b) que se añade una fase estacionaria a la solución. En el caso a), la solución que contiene la sustancia de interés que debe purificarse se pasa por la fase estacionaria, permitiendo una interacción entre la fase estacionaria y las sustancias en solución. Según las condiciones, tales como, por ejemplo, el pH, la conductividad, la concentración de sales, la temperatura y/o el caudal, se unen algunas sustancias de la solución a la fase estacionaria y, de esta manera, resultan eliminadas de la solución. Otras sustancias permanecen en solución. Las sustancias que permanecen en solución pueden encontrarse en el eluido. El "eluido" se refiere a la solución obtenida tras pasar por el dispositivo cromatográfico. En una realización, el dispositivo cromatográfico es una columna con material de cromatografía, o en otra realización, un casete con material cromatográfico de membrana. La sustancia de interés no unida a la fase estacionaria puede recuperarse del eluido mediante métodos que resultarán familiares al experto en la materia, tales como, por ejemplo, la precipitación, la precipitación salina, la ultrafiltración, la diafiltración, la liofilización, la cromatografía de afinidad, o la reducción del volumen de solvente, con el fin de obtener una solución concentrada. En el caso b), se añade la fase estacionaria, por ejemplo en forma de unos polvos, a la solución que contiene la sustancia de interés que debe purificarse, permitiendo una interacción entre la fase estacionaria y las sustancias en solución. Tras la interacción, se elimina la fase estacionaria, por ejemplo mediante filtración, y se obtiene en el sobrenadante la sustancia de interés no unida a la fase estacionaria.

La expresión "no se une a" y equivalentes gramaticales de la misma se refieren a una sustancia de interés, por ejemplo una inmunoglobulina, que permanece en solución al ponerla en contacto con una fase estacionaria, por ejemplo un material de intercambio iónico de membrana. Lo anterior no indica que 100% de la sustancia de interés permanece en solución, sino que permanece en solución esencialmente el 100% de la sustancia de interés; en realizaciones específicas, permanece en solución por lo menos 50% de la sustancia de interés, permanece en solución por lo menos 65% de la sustancia de interés, permanece en solución por lo menos 80% de la sustancia de interés, permanece en solución por lo menos 90% de la sustancia de interés, o permanece en solución más de 95% de la sustancia de interés, según se determina a partir del área de pico de una cromatografía de exclusión por tamaño.

El término "tamponado" se refiere a una solución en la que los cambios de pH debidos a la adición o liberación de sustancias ácidas o básicas resultan compensados por una sustancia tampón. Puede utilizarse cualquier sustancia tampón que resulte en dicho efecto. En una realización se utilizan sustancias tampón farmacéuticamente aceptables, tales como, por ejemplo, ácido fosfórico y sales del mismo, ácido cítrico y sales del mismo, morfolina, ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico y sales del mismo, histidina y sales del mismo, glicina y sales del mismo o tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y sales del mismo. En otra realización, la sustancia tampón se selecciona de entre ácido fosfórico y sales del mismo, ácido cítrico y sales del mismo, o histidina y sales del mismo. Opcionalmente, la solución tamponada puede comprender una sal adicional, tal como, por ejemplo, cloruro sódico, sulfato sódico, cloruro potásico, sulfato potásico, citrato sódico o citrato potásico.

La expresión "modo de unión/elución" y equivalentes gramaticales de la misma se refiere a un modo de operación de un método de purificación, en el que una solución que contiene una sustancia de interés que debe purificarse se pone en contacto con una fase estacionaria, en una realización una fase sólida, en la que la sustancia de interés se une a la fase estacionaria. En consecuencia, la sustancia de interés queda retenida en la fase estacionaria, mientras que las sustancias que no son de interés resultan eliminadas en el eluido o en el sobrenadante. La sustancia de interés es posteriormente eluida de la fase estacionaria en una segunda etapa y, de esta manera, se recupera de la fase estacionaria con una solución de elución.

De esta manera, la presente invención informa de un método para obtener una inmunoglobulina en forma monomérica, en el que el método comprende la etapa siguiente:

aplicar una solución acuosa tamponada que comprende una inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada y/o fragmentos de inmunoglobulina a un material cromatográfico de intercambio aniónico bajo condiciones en las que la inmunoglobulina no se une al material de cromatografía de intercambio aniónico,

en el que la inmunoglobulina en forma monomérica se recupera del eluido y en el que la solución acuosa tamponada presenta un valor de pH de entre 8,0 y 8,5.

5 La expresión "condiciones bajo las que la inmunoglobulina en forma monomérica no se une al material de cromatografía de intercambio aniónico" y equivalentes gramaticales de la misma se refiere a condiciones bajo las que una inmunoglobulina en forma monomérica no se une al material de cromatografía de intercambio aniónico al ponerla en contacto con el material intercambio aniónico. Lo anterior no indica que el 100% de la inmunoglobulina en forma monomérica no se encuentra unido sino que esencialmente el 100% de la inmunoglobulina en forma monomérica no se encuentra unida; en realizaciones específicas no se encuentra unida por lo menos 50% de la  
10 inmunoglobulina en forma monomérica, no se encuentra unida por lo menos 65% de la inmunoglobulina en forma monomérica, no se encuentra unida por lo menos 80% de la inmunoglobulina en forma monomérica, no se encuentra unida por lo menos 90% de la inmunoglobulina en forma monomérica, o no se encuentra unida más de 95% de la inmunoglobulina en forma monomérica al material de intercambio aniónico, según se determina a partir del área de pico en una cromatografía de exclusión por tamaño.

15 Ahora se ha encontrado inesperadamente que una etapa de cromatografía de intercambio aniónico en la que puede obtenerse la inmunoglobulina en forma monomérica a partir de un material de intercambio aniónico en un modo elución puede llevarse a cabo en un intervalo estrecho de valores de pH, de entre 8,0 y 8,5. Inesperadamente, una pequeña desviación de dicho intervalo de valores de pH, por ejemplo a pH 7,0 ó a pH 9,0, reduce dicho efecto. Con  
20 el método según la invención resulta posible separar en una única etapa la inmunoglobulina en forma monomérica de la inmunoglobulina en forma agregada y de los fragmentos de inmunoglobulina.

El método según la invención puede utilizarse como un método de una única etapa o combinarse con otras etapas, tales como, por ejemplo, en una realización con una etapa de cromatografía de proteína A o una etapa de  
25 cromatografía hidrofóbica de inducción de carga.

En una realización, el material de cromatografía de intercambio aniónico es un material de cromatografía de intercambio aniónico de membrana. También resulta ventajoso, por ejemplo, separar el volumen principal de proteínas de la célula huésped y productos secundarios del cultivo en una etapa principal de purificación utilizando  
30 una cromatografía de afinidad. La cromatografía de afinidad puede ser, por ejemplo, una cromatografía de afinidad de proteína A, una cromatografía de afinidad de proteína G, una cromatografía hidrofóbica de inducción de carga (CHIC) o una cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH, por ejemplo con fenil-sefarosa, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico). En una realización, el método según la invención comprende una etapa de cromatografía de proteína A o una etapa de cromatografía CHIC antes de la etapa de cromatografía de intercambio  
35 aniónico.

En una realización del método según la invención, en la que el método comprende más de una etapa cromatográfica, antes de la aplicación de una solución a una etapa (o a una etapa posterior) del método de purificación, deben ajustarse parámetros tales como, por ejemplo, el valor del pH o la conductividad de la solución.  
40 En una realización, el valor del pH de la solución acuosa tamponada aplicada al material de cromatografía de intercambio aniónico es de entre 8,0 y 8,5.

Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que resulta posible llevar a  
45 cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

#### Descripción de las figuras

50 Figura 1a Una solución que contiene un anticuerpo anti-CCR5 se ajustó a pH 7,0, 7,5 y 8,0 (fracciones denominadas carga a pH x,x); se pusieron en contacto 5 mg de proteína en cada caso con un adsorbedor de membrana de 15 cm<sup>2</sup> en modo elución (fracciones denominadas eluido a pH x,x). Las sustancias unidas se eluyeron con cloruro sódico (fracciones denominadas elución a pH x,x). Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE con tinción de azul brillante de Coomassie.

55 Figura 1b Una solución que contiene un anticuerpo anti-CCR5 se ajustó a pH 8,5 y 9,0 (fracciones denominadas carga a pH x,x); se pusieron en contacto 5 mg de proteína en cada caso con un adsorbedor de membrana de 15 cm<sup>2</sup> en modo elución (fracciones denominadas eluido a pH x,x). Las sustancias unidas se eluyeron con cloruro sódico (fracciones denominadas elución a pH x,x). Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE con tinción de Coomassie.

60 Figura 1c Comparación de fracciones de carga y eluido de una solución que contenía anticuerpo anti-CCR5 a pH 7,5 (A y B) y fracciones de carga y eluido a pH 8,5 (C y D) mediante cromatografía analítica

de exclusión por tamaño. Los agregados y fragmentos pueden detectarse en el eluido a pH 7,5 pero no a pH 8,5.

- 5      Figura 2a      Gráfico que muestra las fracciones de carga y elución de un anticuerpo de CD19 a pH 7,5 (A) y a pH 8,5 (B). Los agregados pueden detectarse en el eluido a pH 7,5 pero no en el eluido a pH 8,5.
- Figura 2b      Tabla que muestra la eliminación de los agregados de soluciones de anticuerpo anti-CCR5 y anti-CD19. Reducción en el eluido es a valores de pH superiores a 7,5, tal como 8,5.
- 10     Figura 3      Experimento de incremento progresivo: Se ajustó una solución que contenía un anticuerpo anti-CCR5 a pH 8,5 y se bombearon 25 mg a través de un adsorbedor de membrana de 75 cm<sup>2</sup> (fracciones denominadas eluido a pH x,x). Las sustancias unidas se eluyeron con cloruro sódico (fracciones denominadas elución a pH x,x). Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE con tinción de Coomassie.
- 15     Figura 4      Se ajustó a pH 8,5 una solución que contenía un anticuerpo anti-CCR5 (fracción denominada carga a pH 8,5) y se bombearon 6 mg de proteína por una columna de cromatografía de intercambio aniónico Q-Sepharose<sup>®</sup> de flujo rápido de 1 ml (fracciones denominadas eluido a pH 8,5). La columna se eluyó con cloruro sódico (fracciones denominadas elución a pH 8,5). Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE con tinción de Coomassie.
- 20

### Ejemplos

25      Materiales y métodos:

#### Eluido acondicionado de proteína A:

30      Se purificó un anticuerpo anti-CCR5 (en lo sucesivo denominado mAb CCR5; ver, por ejemplo, el documento n° WO 2006/103100) y un anticuerpo anti-CD19 (en lo sucesivo denominado mAb CD19) en una primera etapa de cromatografía de afinidad de proteína A.

35      El mAb CCR5 se eluyó de la columna de proteína A bajo condiciones ácidas. Antes del procesamiento posterior, se ajustó el valor del pH de la fracción que contenía la inmunoglobulina mediante diálisis frente a una solución tamponada (por ejemplo tampón tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) o fosfato) hasta valores de pH de 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 y 9,0. Este material se denomina a continuación eluido acondicionado de proteína A o mAb CCR5.

40      El mAb CD19 se eluyó de la columna de proteína A bajo condiciones ácidas. Antes del procesamiento posterior, se ajustó el valor del pH de la fracción que contenía la inmunoglobulina mediante diálisis frente a una solución tamponada (por ejemplo tampón tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) o fosfato) hasta un valor de pH de 8,5. Este material se denomina a continuación eluido acondicionado de proteína A o mAb CD19.

#### Método analíticos:

45      Cromatografía de exclusión por tamaño:

        resina: TSK 3000 (Tosohaas)  
        columna: 300 x 7,8 mm  
        caudal: 0,5 ml/min  
        tampón: tampón de fosfato potásico 200 mM que contenía cloruro potásico 250 mM, ajustado a pH 7,0  
50      longitud de onda: 280 nm

        SDS-PAGE:

55      Tampón para muestras LDS, concentrado cuatro veces (4x): 4 g de glicerol, 0,682 g de base TRIS, 0,666 g de hidrocloreto de TRIS, 0,8 g de LDS (dodecilsulfato de litio), 0,006 g de EDTA (ácido etilén-diamín-tetraacético), 0,75 ml de una solución al 1% en peso (p/p) de Serva Blue G250 en agua, 0,75 ml de una solución al 1% en peso (p/p) de rojo fenol, adición de agua hasta un volumen total de 10 ml.

60      La solución que contenía la inmunoglobulina se centrifugó para eliminar los residuos. Se mezcló una alícuota del sobrenadante clarificado con 1/4 volúmenes (v/v) de tampón para muestras 4xLDS y 1/10 volúmenes (v/v) de 1,4-ditiotreitol (DTT) 0,5 M. A continuación, las muestras se incubaron durante 10 minutos a 70°C y se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE. Se utilizó el sistema de gel premoledado NuPAGE<sup>®</sup> (Invitrogen Corp.) siguiendo las

instrucciones del fabricante. En particular se utilizaron geles premoldeados NuPAGE® Novex® Bis-TRIS al 10% (pH 6,4) y un tampón de migración NuPAGE® MOPS.

Ejemplo 1

5 Se ajustaron eluidos acondicionados de proteína A de mAb CCR5 con pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 y 9,0 a una concentración de 1 mg/ml. Se aplicaron 5 ml de cada solución separadamente a un adsorbedor de membrana Q (material de intercambio aniónico de membrana; área de membrana: 15 cm<sup>2</sup>) regenerado y equilibrado (al pH correspondiente) en modo elución con ayuda de un sistema cromatográfico. A continuación se lavó la membrana con  
10 tampón del pH correspondiente. La proteína unida se eluyó con un gradiente salino a los valores de pH correspondientes.

15 Se encontró que el mAb CCR5 no se unía a pH 7,0 ni a pH 7,5 al adsorbedor de membrana. Se consiguió una unión ligera entre pH 8,0 y 8,5. A pH 9,0 apareció una unión fuerte del anticuerpo. El análisis del eluido y fracciones de elución mediante cromatografía de exclusión por tamaño y SDS-PAGE reveló una eliminación significativa de los agregados de inmunoglobulinas y de fragmentos de inmunoglobulina del eluido a pH 8,0 y 8,5. No se observó  
20 eliminación a pH 7,0 y 7,5 y se produjeron pérdidas elevadas de producto debido a la unión a la matriz a pH 9,0. Con elución impulsada por la conductividad a pH 8,0 y a pH 8,5, se obtuvieron fracciones enriquecidas en agregados de inmunoglobulina y en fragmentos de inmunoglobulina.

Ejemplo 2

25 Se ajustó a una concentración de 1 mg/ml cada uno de los eluidos acondicionados de proteína A de mAb CD19 a pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 y 9,0. Se aplicaron 5 ml de cada solución separadamente a un adsorbedor de membrana Q (15 cm<sup>2</sup>) regenerado y equilibrado (al pH correspondiente) en modo elución con ayuda de un sistema cromatográfico. A continuación se lavó la membrana con tampón del pH correspondiente. La proteína unida se eluyó con un gradiente salino a los valores de pH correspondientes.

30 Se encontró que el mAb CD19 no se unía a pH 7,0 ni a pH 7,5 al adsorbedor de membrana. Se consiguió una unión ligera entre pH 8,0 y 8,5. A pH 9,0 apareció una unión fuerte de la inmunoglobulina. El análisis del eluido y fracciones de elución mediante cromatografía de exclusión por tamaño y SDS-PAGE reveló una eliminación significativa de los agregados de inmunoglobulinas y fragmentos de inmunoglobulina de la inmunoglobulina del producto a pH 8,0 y 8,5. No se observó eliminación a pH 7,0 y 7,5 y se produjeron pérdidas elevadas de producto debido a la unión a la matriz a pH 9,0. Con elución impulsada por la conductividad a pH 8,0 y a pH 8,5, se obtuvieron  
35 fracciones enriquecidas en agregados de inmunoglobulina y en fragmentos de inmunoglobulina.

Ejemplo 3

40 Un eluido de proteína A de mAb CCR5 se acondicionó a pH 8,5 y se ajustó a una concentración de 1 mg/ml.

45 Se aplicaron 25 ml de cada solución separadamente a un adsorbedor de membrana Q (75 cm<sup>2</sup> de área de superficie de membrana) regenerado y equilibrado (a pH 8,5) en modo elución con ayuda de un sistema cromatográfico. A continuación se lavó la membrana con tampón de pH 8,5. La proteína unida se eluyó con un gradiente salino a los valores de pH correspondientes.

El resultado del Ejemplo 1 pudo reproducirse a una escala 5 veces mayor. El eluido estaba empobrecido en agregados de inmunoglobulina y fragmentos de inmunoglobulina. Ambas impurezas pudieron ser eluidas del adsorbedor de membrana con un gradiente salino.

50 Ejemplo 4

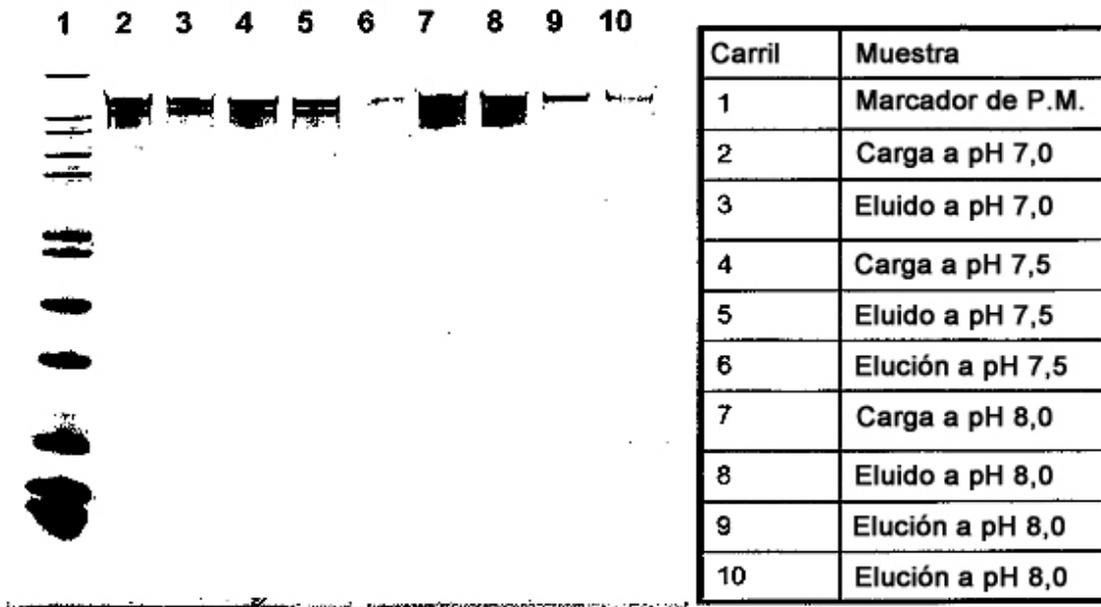
Un eluido de proteína A acondicionado de mAb CCR5 a pH 8,5 se ajustó a una concentración de 1 mg/ml. Se aplicaron 6 ml de la solución a un adsorbedor de membrana Q FF regenerado y equilibrado (a pH 8,5) en modo elución con ayuda de un sistema cromatográfico. A continuación se lavó la sefarosa con tampón del pH correspondiente. La proteína unida se eluyó con un gradiente salino a los valores de pH correspondientes.

60 El análisis del eluido y fracciones de elución mediante cromatografía de exclusión por tamaño y SDS-PAGE reveló una eliminación significativa de los agregados de inmunoglobulinas y fragmentos de inmunoglobulina de la inmunoglobulina del producto a pH 8,5. Con elución impulsada por la conductividad a pH 8,0 y a pH 8,5, se obtuvieron fracciones enriquecidas en agregados de inmunoglobulina y en fragmentos de inmunoglobulina.

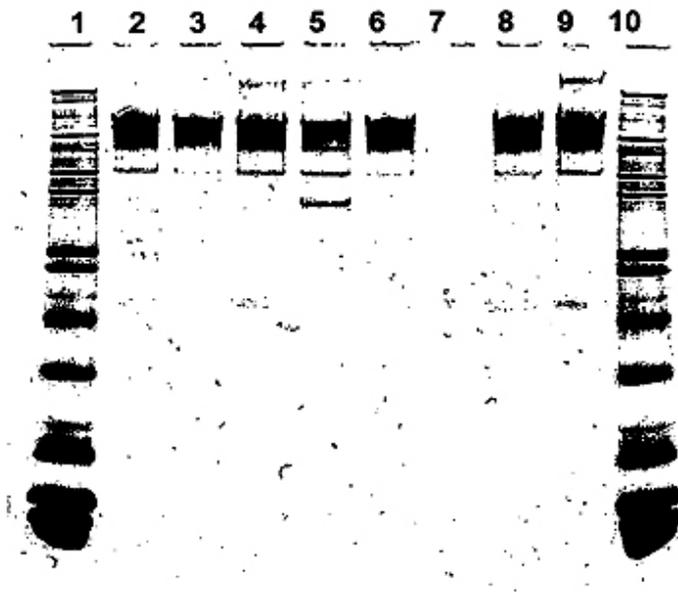
**REIVINDICACIONES**

1. Método para obtener una inmunoglobulina en forma monomérica, en el que el método comprende la etapa siguiente:  
5 aplicar una solución acuosa tamponada que comprende una inmunoglobulina en forma monomérica y en forma agregada y/o fragmentos de inmunoglobulina a un material cromatográfico de intercambio aniónico, en el que la solución acuosa tamponada presenta un valor de pH de entre pH 8,0 y pH 8,5, y en el que la inmunoglobulina empobrecida en agregados de inmunoglobulina y fragmentos de inmunoglobulina se recupera del eluido del material de cromatografía de intercambio aniónico y de esta manera se obtiene una inmunoglobulina en  
10 forma monomérica.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho material de cromatografía de intercambio aniónico es un material de cromatografía de intercambio aniónico de membrana.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho material de cromatografía de intercambio aniónico es un material de intercambio aniónico fuerte que presenta un grupo de amonio cuaternario como sustituyente cargado.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho método comprende antes de la etapa a) una etapa adicional de cromatografía de proteína A o una etapa de cromatografía hidrofóbica de inducción de carga.

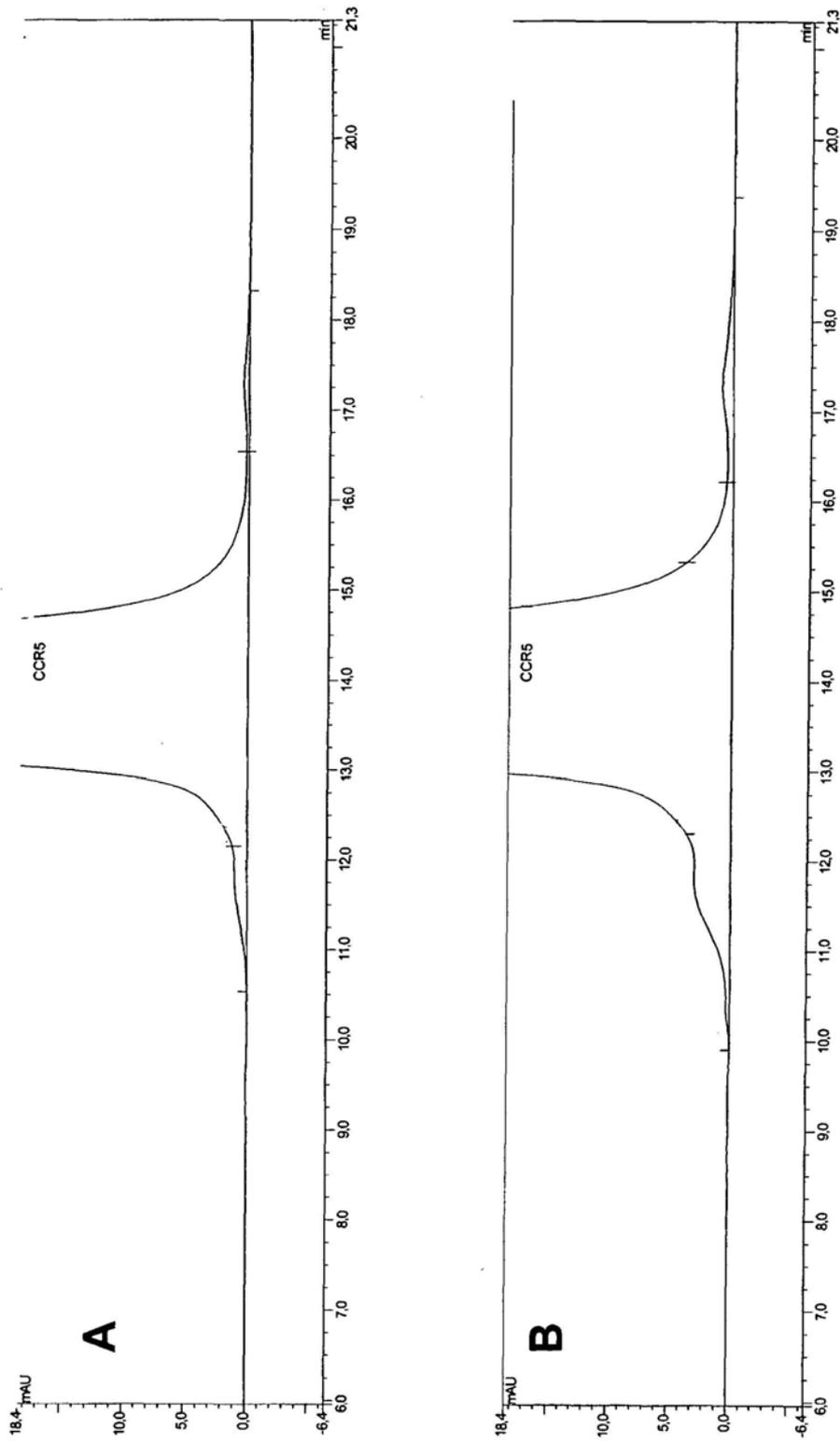
**Fig. 1a**



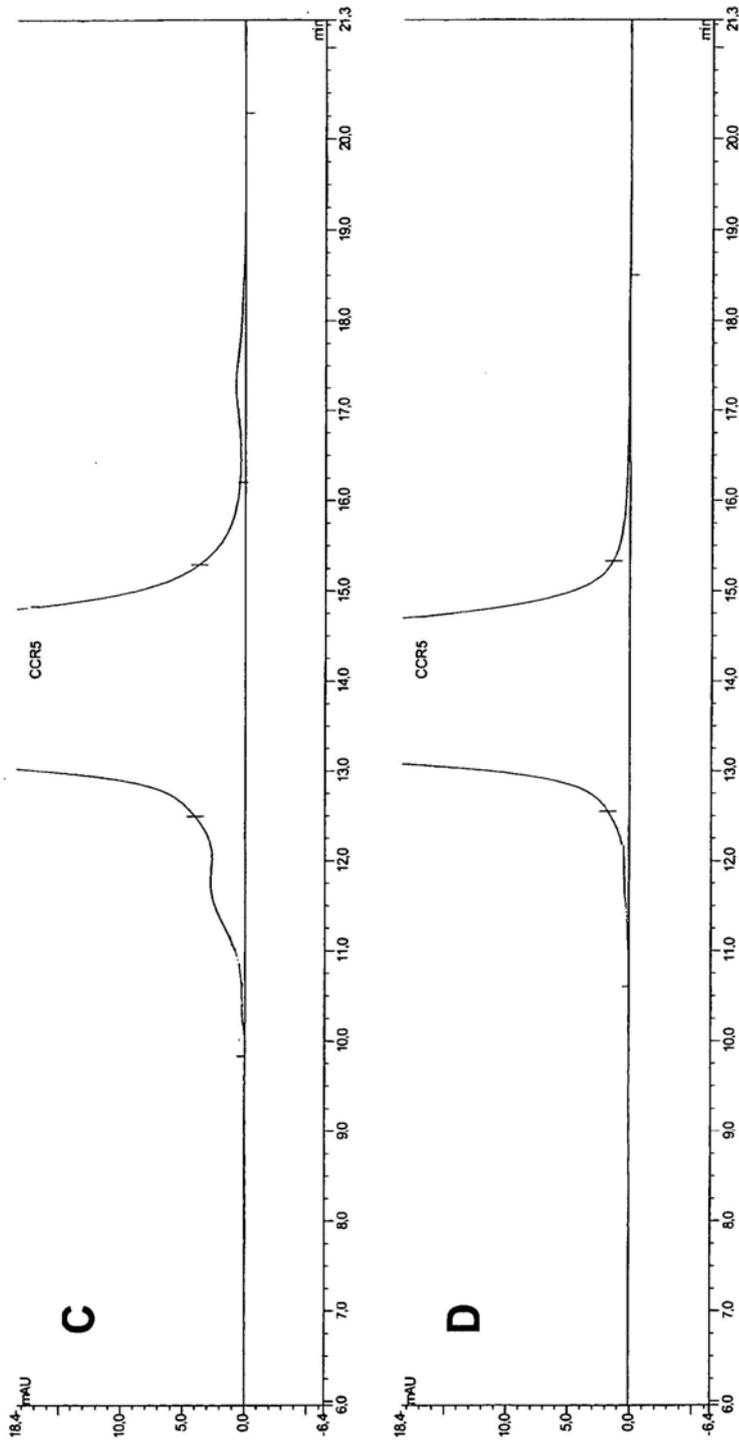
**Fig. 1b**



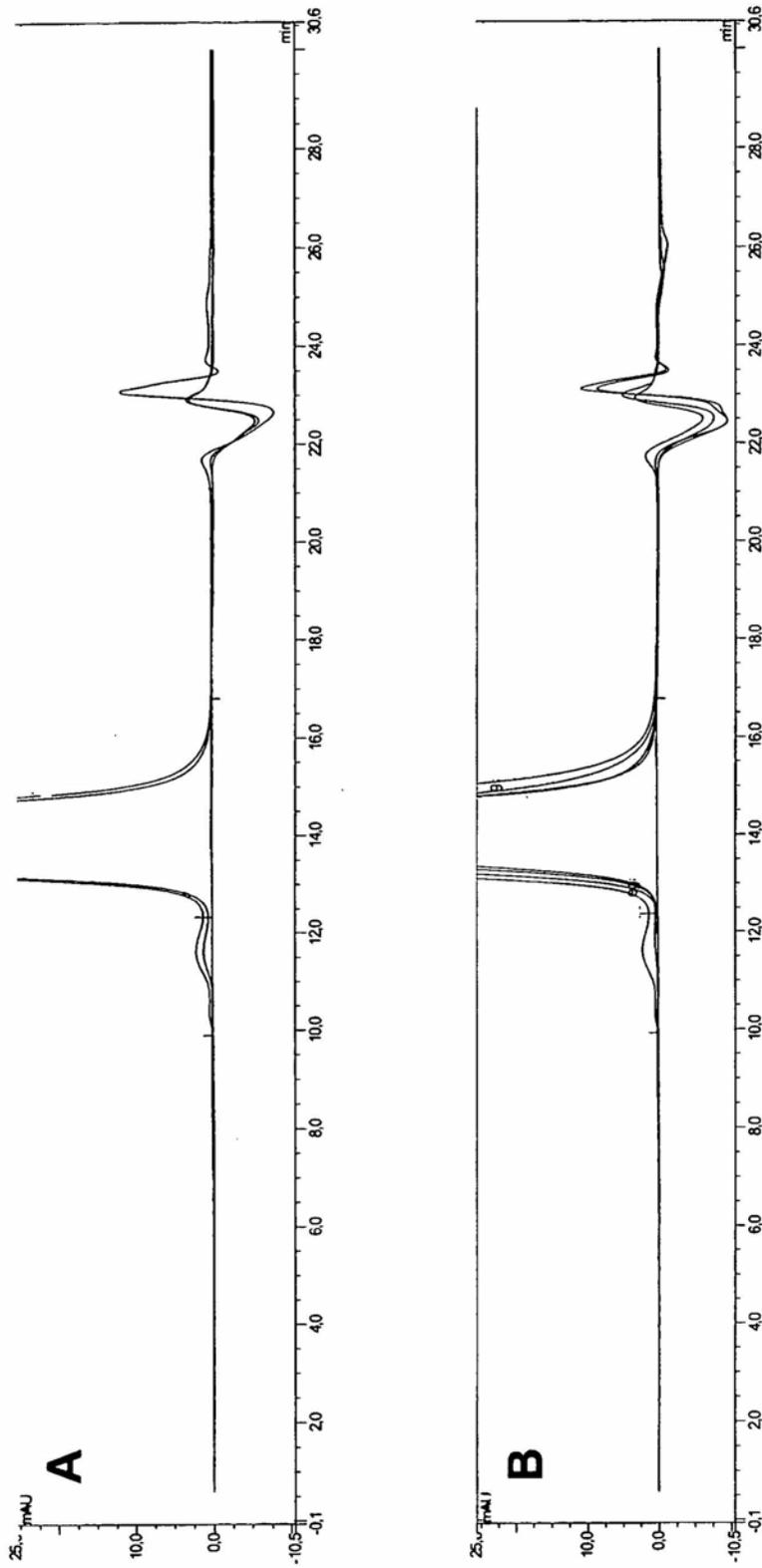
Carril	Muestra
1	Marcador de P.M.
2	Carga a pH 8,5
3	Eluido a pH 8,5
4	Elución a pH 8,5
5	Elución a pH 8,5
6	Carga a pH 9,0
7	Eluido a pH 9,0
8	Elución a pH 9,0
9	Elución a pH 9,0
10	Marcador de P.M.



**Fig. 1c**



**Fig. 1c**  
**(cont.)**

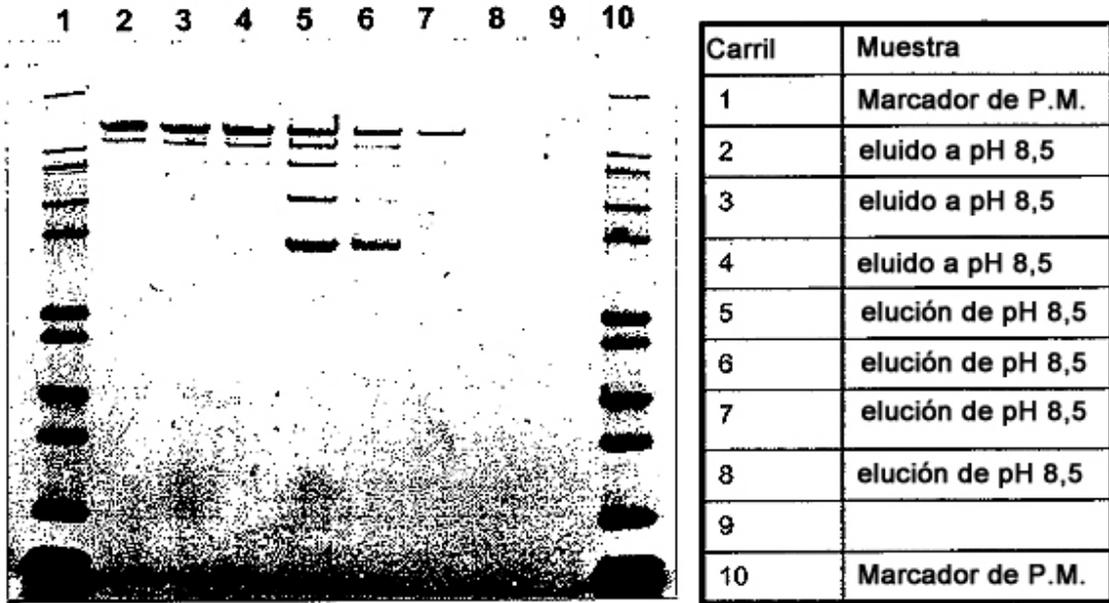


**Fig. 2a**

**Fig. 2b**

<b>anticuerpo anti-CCR5 en membrana Q</b>	<b>carga</b>	<b>eluido</b>
<b>pH 7,5</b>	<b>1,20% de agregados</b>	<b>0,76% de agregados</b>
<b>pH 8,5</b>	<b>1,44% de agregados</b>	<b>0,37% de agregados</b>
<b>anticuerpo anti-CD19 en membrana Q</b>	<b>carga</b>	<b>eluido</b>
<b>pH 7,5</b>	<b>0,89% de agregados</b>	<b>0,41% de agregados</b>
<b>pH 8,5</b>	<b>0,94% de agregados</b>	<b>inferior al límite de detección</b>

**Fig. 3**



**Fig. 4**

