

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 492 681**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/22** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2011 E 11700457 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 2526114**

54 Título: **Método cromatográfico para purificar proteínas que contienen FC**

30 Prioridad:

**05.08.2010 EP 10171975**

**22.01.2010 EP 10151416**

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

**10.09.2014**

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL  
GMBH (100.0%)  
Binger Strasse 173  
55216 Ingelheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**ECKERMANN, CHRISTIAN;  
AMBROSIUS, DOROTHEE;  
NOTHELFER, FRANZ y  
RATHJEN, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 492 681 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

Método cromatográfico para purificar proteínas que contienen FC

5 La presente invención se refiere a métodos cromatográficos para purificar proteínas y a medios para tales métodos.

Las biomoléculas como proteínas, polinucleótidos, polisacáridos y similares tienen una creciente importancia comercial como medicamentos, productos diagnósticos, aditivos alimentarios, aditivos para detergentes y análogos, como reactivos de investigación y para muchas otras aplicaciones. La demanda de estas biomoléculas – p.ej. en el caso de las proteínas – ya no puede satisfacerse normalmente mediante el aislamiento de las moléculas a partir de sus fuentes naturales, sino que requiere el empleo de métodos de producción biotecnológicos.

La elaboración biotecnológica de proteínas suele empezar por el aislamiento del ADN que codifica la proteína deseada y su clonación en un vector de expresión adecuado. Tras la transfección del vector de expresión en células de expresión procariontas o eucariotas adecuadas y la subsiguiente selección de las células transfectadas, éstas se cultivan en fermentadores para que se exprese la proteína deseada. A continuación se recolectan las células o el sobrenadante del cultivo y se procede al acabado y purificación de la proteína que contienen.

En el caso de los sistemas de expresión eucariotas, es decir mediante el uso de cultivos de células de mamíferos como por ejemplo las células CHO o NS0, en los últimos 15 años se ha conseguido incrementar 100 veces la concentración alcanzable de la proteína deseada en los cultivos celulares o en los sobrenadantes del cultivo durante la etapa de expresión. En el mismo espacio de tiempo la capacidad de fijación de los materiales cromatográficos utilizados en la posterior purificación de las proteínas solo ha aumentado 3 veces. Por esta razón hay una necesidad urgente de métodos mejorados y optimizados de purificación de biomoléculas, sobre todo de proteínas, que puedan aplicarse a escala industrial.

En el caso de los biofármacos, como por ejemplo las proteínas empleadas como medicamentos, p.ej. anticuerpos terapéuticos, aparte del rendimiento de los productos también es muy importante la separación de las impurezas. Aquí hay que distinguir entre impurezas del proceso e impurezas del producto. Las impurezas que dependen del proceso contienen componentes de las células huésped como proteínas (proteínas de célula huésped, "*Host cell proteins*", HCP) y ácidos nucleicos procedentes del cultivo celular (como partes integrantes de los medios) o de la purificación (como por ejemplo sales o ligandos cromatográficos desprendidos). Las impurezas que dependen del producto son variantes moleculares del mismo con propiedades distintas, incluyendo formas más cortas como los precursores y los productos de descomposición hidrolítica, e incluso formas modificadas surgidas, por ejemplo, a causa de desaminaciones, glicosilaciones erróneas o puentes disulfuro mal unidos. Entre las variantes del producto también cabe citar polímeros y agregados. Otro tipo de impurezas son los contaminantes. Se consideran como tales todas las demás sustancias de naturaleza química, bioquímica o microbiológica que no pertenecen directamente al proceso de producción. Son contaminantes p.ej. los virus que pueden aparecer de manera indeseada en los cultivos celulares.

En el caso de los biofármacos las impurezas generan dudas de seguridad que se agravan cuando la administración de las proteínas terapéuticas – muy frecuente en los biofármacos – tiene lugar por inyección o infusión directa en el torrente sanguíneo. Así, por ejemplo, hay componentes de las células huésped que pueden producir reacciones alérgicas o efectos inmunopatológicos. Además las impurezas también pueden inducir una respuesta inmunitaria no deseada al producto administrado, es decir una reacción inmunitaria no deseada del paciente al agente terapéutico, hasta llegar a un choque anafiláctico de riesgo mortal. Por lo tanto se necesitan procedimientos de purificación adecuados que permitan reducir todas las sustancias no deseadas hasta una cantidad inocua. Por otra parte en el caso de los biofármacos tampoco se pueden ignorar los aspectos económicos. Así los procesos de producción y purificación no deben comprometer la rentabilidad del producto biofarmacéutico resultante. También juega un papel considerable el tiempo necesario para establecer un nuevo proceso de purificación: además de influir en los costes el desarrollo del proceso debe estar coordinado con el desarrollo preclínico y clínico del medicamento. P.ej. ciertos estudios preclínicos y todos los estudios clínicos no pueden empezar hasta disponer de suficientes cantidades del producto biofarmacéutico con un grado de pureza adecuado.

55 Como punto de partida para desarrollar un proceso de purificación de un anticuerpo que también se pueda realizar a gran escala puede servir p.ej. el siguiente procedimiento estándar, formado por cuatro etapas básicas: en la primera etapa la proteína buscada se aísla, se concentra y se estabiliza ("captura"). En la segunda etapa se eliminan los virus; en la tercera se lleva a cabo una purificación, reduciendo la mayor parte de impurezas como ácidos nucleicos, otras proteínas y endotoxinas. En la última etapa se eliminan las trazas de contaminantes que aún puedan quedar ("pulido").

Además de las etapas de filtración y precipitación son muy importantes los métodos cromatográficos (de columna). La "captura" suele incluir, por ejemplo, una etapa de purificación por cromatografía de afinidad. Por consiguiente hoy en día se conocen numerosos métodos de cromatografía de columna y materiales cromatográficos utilizables en ella.

Las matrices de cromatografía de afinidad, también designadas en lo sucesivo como matrices de afinidad, se usan como fase estacionaria en la purificación industrial de diversas sustancias. Sobre ligandos inmovilizados se pueden concentrar y purificar específicamente sustancias que poseen una determinada afinidad por los respectivos ligandos empleados. Para la purificación industrial de anticuerpos (inmunoglobulinas), sobre todo monoclonales, ha dado buen resultado el uso de proteína A inmovilizada en la etapa inicial. La proteína A es una proteína de unos 41 kDA del *Staphylococcus aureus*, que se fija con gran afinidad ( $10^{-8}$  M -  $10^{-12}$  M a IgG humana) al dominio CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> de la región Fc de las inmunoglobulinas. En la cromatografía de proteína A, las inmunoglobulinas o proteínas de fusión de la fase móvil que poseen una región Fc fijadora de proteína A se fijan específicamente al ligando de proteína A que está acoplado mediante enlace covalente a un soporte (p.ej. Sefarosa). La proteína A de *Staphylococcus aureus* (proteína A natural), así como la proteína A recombinante (proteína A rec.) modificada genéticamente, interactúan de forma no covalente con la región constante (fragmento Fc) de los anticuerpos. Esta interacción específica se puede aprovechar para separar eficientemente las impurezas de los anticuerpos. Mediante una variación del pH se puede anular selectivamente la interacción entre los anticuerpos y los ligandos de proteína A y liberar o eluir los anticuerpos de la fase estacionaria.

Esta efectividad de la cromatografía de afinidad se puede incrementar lavando la fase estacionaria tras la carga, lo cual significa el empleo de una fase móvil que elimine las impurezas de la fase estacionaria, pero no el producto buscado. En la cromatografía de afinidad de anticuerpos mediante matrices de proteína A se han usado tampones de lavado que contienen arginina, isopropanol, NaCl o un detergente (patentes WO2008031020, WO2007109163, WO2007081906, WO2003066662, Comunicación técnica de Millipore TB1026EN00), pero no la combinación de estos componentes en un solo tampón de lavado. En la patente US 6,870,034 B2 se describió una combinación de dos de estos componentes, una sal y un detergente, es decir un polímero como p.ej. polietilenglicol, polipropilenglicol y copolímeros formados por los mismos.

#### Resumen de la presente invención

Se encontró sorprendentemente que la cromatografía de proteína A produce la proteína buscada con mayor pureza empleando una determinada combinación de componentes en un solo tampón de lavado que usando los mismos componentes por separado uno tras otro. Además el tampón de lavado de la presente invención se puede usar de manera estándar en la purificación de anticuerpos y como permite omitir etapas de optimización acorta la extensión del método.

La presente invención se refiere a un método para disminuir las impurezas de una composición que contiene una proteína con el dominio Fc de una inmunoglobulina (proteína buscada) mediante una cromatografía de proteína A que consta de las siguientes etapas:

- a) uso de una fase móvil que contiene la proteína buscada sobre una fase estacionaria que lleva la proteína A, en unas condiciones en que la proteína buscada se fija a la fase estacionaria;
- b) uso de un tampón de lavado con un pH comprendido entre 5 y 8 como fase móvil, que lleva como aditivos
  - i) arginina a una concentración de 0,1 - 1 mol/l,
  - ii) cloruro sódico a una concentración de 0,2 hasta 2 mol/l,
  - iii) un alcohol elegido del grupo formado por isopropanol, n-propanol y etanol a una concentración del 5 - 30% (p/v) y
  - iv) polivinilpirrolidona y/o un detergente a una concentración del 0,05 - 2% (p/v);
- c) uso de un tampón de elución como fase móvil, en unas condiciones en que la proteína buscada es eluida de la fase estacionaria.

En otro aspecto el tampón de lavado tiene un pH de 6 a 8.

La concentración de arginina en el tampón de lavado es preferiblemente de 0,4 - 0,6 mol/l, sobre todo de 0,5 mol/l. La concentración de cloruro sódico en el tampón de lavado es preferiblemente de 0,9 - 1,1 mol/l, sobre todo 1 mol/l. Como alcohol en el tampón de lavado se usa preferiblemente isopropanol a una concentración del 10 - 20% (v/v), sobre todo a una concentración del 15% (v/v).

La polivinilpirrolidona (PVP) se usa preferiblemente a una concentración del 0,1 - 2% (p/v), sobre todo del 0,25% (p/v). Además o como alternativa se puede usar polioxietilen-sorbitan-monolaurato (Polisorbato 20, Polisorbato 80) a una concentración del 0,05 - 2% (p/v).

En otro aspecto la presente invención se refiere a un tampón de lavado para la cromatografía de afinidad, con un pH de 5 hasta 8, que contiene

- i) arginina a una concentración de 0,1 - 1 mol/l,
- ii) cloruro sódico a una concentración de 0,2 hasta 2 mol/l,
- iii) un alcohol elegido del grupo formado por isopropanol, n-propanol y etanol a una concentración del 5 - 30% (p/v) y
- iv) polivinilpirrolidona o un detergente a una concentración del 0,05 - 2% (p/v).

Breve descripción de las figuras

**Fig. 1** muestra los rendimientos (1a), turbideces (1b), contenidos de monómero (1c) y cantidades de HCP (1d) en el producto de la cromatografía de afinidad tras la elución con tampones de lavado de distinta combinación y composición, usando como ejemplo el anticuerpo BI-MAb 06a. Las cifras sobre el eje de abscisas se refieren a los aditivos del tampón de lavado citados en el ejemplo.

**Fig. 2** muestra los rendimientos (2a), turbideces (2b), contenidos de monómero (2c) y cantidades de HCP (2d) en el producto de la cromatografía de afinidad tras la elución con tampones de lavado de distinta combinación y composición, empleando como ejemplo el anticuerpo BI-MAb 1003a. Las cifras sobre el eje de abscisas se refieren a los aditivos del tampón de lavado citados en el ejemplo.

**Fig. 3** compara la cantidad de HCP en el producto de la cromatografía de afinidad tras la elución con tampones de lavado de distinta combinación y composición, empleando como ejemplo BI-MAb 07c. Las cifras sobre el eje de abscisas se refieren a los aditivos del tampón de lavado citados en el ejemplo.

**Fig. 4** compara la cantidad de HCP en el producto de la cromatografía de afinidad tras la elución con tampones de lavado de distinta combinación y composición, empleando como ejemplo BI-MAb 1001b. Las cifras sobre el eje de abscisas se refieren a los aditivos del tampón de lavado citados en el ejemplo.

Descripción exacta de la presente invención

La presente invención se refiere a métodos de disminución de impurezas, sobre todo de proteínas de la célula huésped ("*Host Cell Proteins*", HCP) y ADN de las composiciones proteicas resultantes de cultivos celulares en los cuales las proteínas se expresan de forma recombinante o endógena. La presente invención se refiere sobre todo a métodos de purificación o concentración de una proteína (proteína buscada) que puede inmovilizarse de manera reversible mediante un ligando a una fase estacionaria y que por tanto son abordables por cromatografía de afinidad.

La proteína buscada puede ser en concreto una inmunoglobulina o una proteína que contenga el dominio Fc de una inmunoglobulina y pueda fijarse a la proteína A. En una forma de ejecución preferida se trata de inmunoglobulina constituida por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Los anticuerpos constan de dos cadenas pesadas idénticas ("*heavy chains*", H) y dos cadenas ligeras idénticas ("*light chains*", L) unidas entre sí por puentes disulfuro covalentes según una estructura en forma de Y. Las cadenas ligeras constan de un dominio variable y un dominio constante designados respectivamente como VL y CL. Por otra parte las cadenas pesadas tienen respectivamente un dominio variable y tres hasta cuatro dominios constantes según la inmunoglobulina. Éstos se designan como VH y CH1, CH2, CH3. Los dominios variables de una cadena ligera y de una cadena pesada forman los sitios de fijación de antígenos. El dominio CH2 lleva una cadena de carbohidrato que constituye un sitio de fijación para el sistema complementario. El dominio CH3 contiene el sitio de fijación del receptor Fc.

La proteína A se fija al dominio Fc de las inmunoglobulinas por interacciones con la cadena pesada. La afinidad de la fijación es máxima en la IgG1, IgG2 e IgG2a humanas, así como en la IgG2b murina. Con afinidad moderada se fija a IgM, IgA e IgE humanas y a IgG3 e IgG1 murinas. Sin embargo no reacciona con IgG3 e IgD humanas ni con las siguientes inmunoglobulinas murinas: IgM, IgA e IgE.

El método de la presente invención se puede aplicar a todas las proteínas buscadas que poseen un dominio Fc, por ejemplo las inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales que se expresan en células de hibridoma o en células huésped recombinantes. Estos anticuerpos pueden estar generados originalmente por inmunización de animales, sobre todo de mamíferos, incluyendo animales transgénicos como p.ej. los ratones que expresan las inmunoglobulinas humanas. También son idóneas como proteínas objetivo aquellas que resultan de la fusión de cualquier proteína con el dominio Fc de una inmunoglobulina.

Matrices de proteína A en el sentido de la presente invención son aquellas matrices de cromatografía de afinidad que contienen proteína A inmovilizada como ligando, incluyendo las matrices de afinidad que contienen proteína A de tipo natural, por ejemplo de *Staphylococcus aureus*, como ligando. Una descripción de proteína A se encuentra, entre otras publicaciones, en Lofdahl, S. y otros, 1983 (Lindmark, R., Thoren-Tolling, K., Sjoquist J (1983); Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera [*Fijación de inmunoglobulinas a proteína A y niveles de inmunoglobulina en sueros de mamíferos*]: J Immunol Methods 1983 Aug 12;62(1):1-13.) y en Lindmark y otros, 1983 (Lindmark, R., Thoren-Tolling, K., Sjoquist J (1983); Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera [*Fijación de inmunoglobulinas a proteína A y niveles de inmunoglobulina en sueros de mamíferos*]: J Immunol Methods 1983 Aug 12;62(1):1-13.). Además la presente invención también se refiere a matrices de proteína A recombinante como ligando. La proteína A recombinante está descrita, por ejemplo, por Duggleby C.J. y Jones, S.A., 1983 (Duggleby, C.J. y Jones, S.A. (1983), Cloning and expression of *Staphylococcus aureus* protein A gene in *Escherichia coli* [*Clonación y expresión del gen de proteína A de Staphylococcus aureus en Escherichia coli*]. Nucl.Acíd.Res. 1983 May 25; 11 (10):3065-76.) o en Li, R. y otros, 1998 (Li, R. Dowd, V., Stewart, D.J., Burton, S.J. Lowe, C.R., Design, synthesis and application of a protein A mimetic [*Diseño, síntesis y aplicación de un mimético de proteína A*]. Nat.Biotechnol. 1998 Feb; 16(2):190-5.) y es conocida del especialista.

Aquí la proteína A puede estar acoplada a diversos materiales soporte, como por ejemplo agarosas, polisacáridos, dextranos, geles de sílice, perlas de vidrio. En Harlow, E. y Lane, D. 1999 se encuentra una relación no excluyente de materiales soporte. Un material soporte usado a menudo está formado por sustancias basadas en agarosa, como p.ej. las conocidas "Sefarosas" de la firma Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia. En el manual de esta compañía del año 2001 se encuentran ejemplos especiales de Sefarosas de proteína A para el tema "cromatografía de afinidad". El especialista conoce asimismo otras matrices de cromatografía de proteína A como p.ej. MabSelect (de la firma Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), STREAMLINE® rProtein A (de la firma Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), Poros A (Millipore, Durham, Inglaterra). El método de la presente invención incluye un tratamiento de las respectivas matrices. La enumeración de matrices debe entenderse como ejemplo y no es excluyente.

En general el ligando se acopla a la matriz soporte mediante grupos libres amino, carboxilo o azufre, mediante activación con bromuro de cianógeno, activación por NHS o acoplamiento con tiol. Véase a este respecto, por ejemplo, el manual "Cromatografía de afinidad" de Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia, 2001. En una forma de ejecución especialmente preferida se usa polivinilpirrolidona (PVP, también polividona o povidona, nº CAS: 9003-39-8) en los tampones de lavado de la presente invención. La polivinilpirrolidona es un polímero soluble en agua constituido por unidades del monómero N-vinilpirrolidona. No obstante también se puede disolver en otros disolventes polares. La PVP es un polvo amorfo higroscópico de color blanco hasta amarillo claro. Los polímeros comerciales corrientes tienen una masa molecular de unos 2.500 hasta 2.500.000 Dalton. En los tampones de lavado de la presente invención también pueden emplearse detergentes además o en vez de PVP. Los detergentes son moléculas surfactantes y anfífilas que pueden formar micelas, es decir agregados de moléculas de detergente cuyo extremo hidrófilo va dirigido afuera, hacia el disolvente acuoso.

Los detergentes en el sentido de la presente invención son tanto sustancias no iónicas como iónicas. No obstante se prefieren los detergentes no iónicos como p.ej. poliglicol-éteres (tipo NP-40, Tergitol NP40, nº CAS: 127087-87-0), un PEG-alkil-éter polioxietileno(23)lauril-éter (nº CAS: 9002-92-0), PEG-ésteres de sorbitán con ácidos grasos como el polioxietileno(20)sorbitan-monolaurato (Polisorbato 20, nº CAS: 9005-64-5) o polioxietileno(20)sorbitan-monooleato (Polisorbato 80, nº CAS: 9005-65-6), alquilfenil-PEG-éteres como el t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton-X-100, nº CAS: 9002-93-1) o copolímeros en bloque de PEO-PPO (derivados de Poloxamer) como el copolímero en bloque polioxietileno-polioxipropileno (Pluronic F 68, Lutrol F 68, Poloxamer 188, nº CAS: 9003-11-6 o Poloxamer 407, Pluronic F 127, Lutrol F 127, nº CAS: 9003-11-6).

Los valores de pH de estos tampones de lavado o elución dependen del sistema global y por lo tanto se suelen determinar y optimizar individualmente para cada sistema.

En un aspecto el tampón de lavado tiene un pH de 5 hasta 8. El especialista ya sabe que el pH al que una proteína se eluye de una columna depende de muchos factores, entre ellos: los sistemas tampón durante la fijación, el lavado y la elución, la presencia de impurezas, la forma geométrica de las partículas de la matriz, el tipo de acoplamiento del ligando de afinidad a la matriz cromatográfica. Sobre todo tienen una influencia decisiva las características específicas de la proteína.

En algunos casos puede haber combinaciones que incluso por encima de un valor de pH 4 eluyan la proteína parcial o totalmente del ligando de afinidad. En tal caso, si una pérdida de proteína es inaceptable, el tampón de lavado debe tener un pH más alto. El especialista ya sabe que entonces debe adaptar convenientemente el pH del tampón de lavado. Sin embargo en la mayoría de los casos el enlace entre la proteína y el ligando de afinidad de proteína A no se deshace hasta que el pH baja de 4.

En otro aspecto el tampón de lavado tiene un pH de 6 hasta 8.

En una típica forma de ejecución la presente invención se puede llevar a cabo, por ejemplo, del siguiente modo:  
La cromatografía de proteína A es en general la primera etapa de purificación. El sobrenadante del cultivo libre de células se puede introducir directamente en la columna o antes se puede realizar una concentración a través de una membrana de ultrafiltración, un sistema llamado UF/DF.

Primero se equilibra la columna de proteína A con tampón de fosfato (PBS) cuyas propiedades físico-químicas son análogas a las del concentrado de carga. El concentrado de carga consta del sobrenadante del cultivo celular, que contiene el producto por purificar y además componentes del medio necesarios para el desarrollo de las células animales empleadas, como por ejemplo células CHO o NS0. Este sobrenadante libre de células o un concentrado del mismo se carga en la columna de proteína A y la proteína buscada se une al sitio de fijación de proteína A en la columna. A continuación se barre la columna con tampón equilibrador hasta la elución de los componentes del medio y de los productos celulares no fijados. El tampón de lavado descrito se puede introducir tras el tampón equilibrador o directamente después de la carga. La cantidad de tampón de lavado depende de la escala y por tanto se indica en relación con el tamaño de la columna cromatográfica.

El volumen de los tampones de lavado suele ser unas 2 hasta 5 veces el volumen de la columna cromatográfica (2-5 volúmenes de lecho, BV). Una vez aplicado el tampón de lavado la columna se puede tratar de nuevo con el tampón

equilibrador o con otro tampón para que ningún componente del tampón de lavado se eluya con el producto. El tampón empleado en este caso debe tener un pH inferior al del tampón de lavado, pero superior al del tampón de elución, y ser análogo al mismo en cuanto a la sal y a la composición. Para eluir se usa un tampón de pH inferior a 4, que como componente principal puede contener, por ejemplo, sales de acetato o citrato. Los tampones de elución pueden contener un acetato a concentraciones entre 10 mM y 200 mM, preferiblemente entre 20 mM y 100 mM, con especial preferencia entre 50 mM y 100 mM, o un citrato a concentraciones entre 10 mM y 200 mM, preferiblemente entre 20 mM y 100 mM. Ambos tampones deben tener el intervalo de pH inferior a 4 arriba citado, preferiblemente entre 3 y 4, con especial preferencia entre 3,4 y 3,6. Además pueden llevar aditivos como arginina o PVP. Asimismo se puede usar un tampón de glicina a concentraciones comprendidas entre 10 y 200 mM, preferiblemente entre 25 y 100 mM, con un valor de pH entre 2 y 3,5, u otros tampones adecuados para reducir la fijación entre el dominio Fc del anticuerpo y la proteína A. Después el producto eluido se puede seguir purificando en la siguiente etapa, por ejemplo mediante incubación a pH bajo o neutralización.

### Ejemplos

Se realizaron ensayos con distintas proteínas procedentes de diferentes líneas celulares (CHO y NS0) fermentadas en diversos medios y cuyos fragmentos Fc pertenecen a subtipos de IgG diferentes (IgG1, IgG2, IgG4).

Se efectuaron respectivamente series de ensayos en los cuales solo se varió del procedimiento estándar el o los tampones de lavado. Se empleó el tampón equilibrador sin aditivos, un tampón de lavado con un solo aditivo, varios tampones seguidos con un aditivo, respectivamente, o bien un tampón de lavado con una combinación de varios aditivos.

La solución proteica aplicada fue siempre la misma para cada proteína. En cada ensayo se midió la cantidad de impurezas en el producto eluido. Por comparación entre los ensayos se identificó respectivamente el tampón de lavado que daba la menor cantidad posible de impurezas en el producto eluido. En algunos ensayos se midieron también los rendimientos, las turbideces y los contenidos de monómero.

### Cromatografía

Los ensayos cromatográficos se realizaron en un sistema automatizado ÄKTA-FPLC modelo 900 (GE Healthcare). En ellos se usaron cuatro productos distintos, de los cuales se utilizó respectivamente como material de partida el sobrenadante de cultivo exento de células o concentrado diez veces con una membrana Omega de 50 kD (Pall) y a continuación se diafiltró tres veces con PBS.

Las columnas empleadas tenían un volumen de 1 ml hasta 8 ml y contenían el gel de cromatografía MabSelect o MabSelect Xtra (GE Healthcare).

### Tampones

En todos los ensayos se usó como tampón equilibrador un tampón de fosfato (PBS) con fosfato 10 mM, cloruro potásico 5 mM y cloruro sódico 140 mM a pH 7,4.

Todos los tampones de lavado estaban basados en un tampón de PBS (pH 7,4) con 8 mmol/l de monohidrógenofosfato sódico, 1,5 mmol/l de dihidrógenofosfato potásico, cloruro potásico 2,7 mM y cloruro sódico 140 mM.

Como aditivos se utilizaron respectivamente, solos o en distintas combinaciones (como se indica en las figuras):

- (1) 860 mmol/l de cloruro sódico (contenido total 1 mol/l de cloruro sódico)
- (2) 0,25% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP)
- (3) 15% (v/v) de isopropanol
- (4) 0,5 mol/l de L-arginina

Para la elución se usaron distintos tampones según cada producto, con diferente concentración de acetato y pH. Se emplearon las siguientes concentraciones:

- BI-Mab 06a: acetato 100 mM, pH 3,4
- BI-Mab 1003a: acetato 50 mM, pH 3,4
- BI-Mab 1001 b: acetato 50 mM, pH 3,4
- BI-Mab 07c: acetato 50 mM, pH 3,6

### Análisis

Se comparó el contenido de impurezas de los productos eluidos en los ensayos y se determinaron sus rendimientos.

Para determinar la cantidad de componentes celulares se usó un ensayo ELISA-Sándwich genérico que indica las proteínas de la célula huésped como parámetro global. En el ensayo se usan anticuerpos policlonales de detección.

5 Para determinar el contenido de monómero se usó el sistema de HPLC Agilent Serie 1200 (Waters) y una columna TSK 3000SW o TSK 3000SWXL (TosoH) según cada proteína. El método isocrático funciona a un flujo de 1 ml/min con un tampón Tris a pH 7,0.

10 El ADN se determina según el método umbral (Kung, V.T. y otros, Picogram Quantitation of Total DNA Using DNA-Binding Proteins in a Silicon Sensor-Based System [*Cuantificación en picogramos del ADN total mediante proteínas fijadoras de ADN en un sistema basado en sensores de silicio*], Anal. Biochem. 1990, 187, 220-227).

15 Para realizar una SDS-PAGE se usa un sistema Phast (GE Healthcare). Las muestras se separan con un gel de SDS Phast (4%-15%, GE). La tinción se efectúa con plata según el método de Heukeshoven (Heukeshoven, Dernick 1988, Electrophoresis 9 (1), páginas 28-32).

20 Para determinar la cantidad de anticuerpos en la carga y en el producto eluido se empleó una columna de proteína A PA 2-1001-00 (Applied Biosystems) y un sistema de HPLC Agilent Serie 1200 (Waters). La fijación y la elución tienen lugar mediante un gradiente de pH 7,4 hasta pH 2,8 en el sistema tampón de PBS y su valoración mediante una calibración externa del respectivo anticuerpo.

La turbidez se mide en el turbidímetro 2100AN (Hach) después de calibrarlo con el patrón del fabricante.

## Resultados

### 25 Ensayos con BI-MAb 06a, un anticuerpo de la subclase IgG1

Los ensayos demuestran una clara influencia del lavado en el rendimiento, el monómero, la turbidez y las proteínas de la célula huésped (*Host Cell Proteins*, HCP).

30 En cuanto a los criterios cualitativos de rendimiento, contenido de monómero y disminución de HCP, el producto eluido da el mejor valor tras el lavado con el tampón que contiene los cuatro aditivos. Además la combinación de aditivos reduce considerablemente la turbidez, tanto con la combinación de los tres componentes 0,86 mol/l de cloruro sódico, 0,25% (p/v) de PVP y 15% (v/v) de isopropanol, como con la combinación de los cuatro componentes 0,86 mol/l de cloruro sódico, 0,25% (p/v) de PVP, 15% (v/v) de isopropanol y 0,5 mol/l de arginina.

### 35 Ensayos con BI-MAb 1003a, un anticuerpo de la subclase IgG1

40 La mejor reducción de HCP se consigue con el tampón de lavado que contiene todos los cuatro componentes. El tampón de lavado con la combinación de cloruro sódico, PVP e isopropanol también da buenos valores. Al lavar con tampones que llevan individualmente los cuatro componentes se obtiene más HCP en el producto eluido.

La combinación de las sustancias de lavado en un solo tampón también da un mejor valor de turbidez.

### 45 Ensayos con BI-MAb 07c, un anticuerpo de la subclase IgG4

Los productos eluidos de los ensayos con los tampones de lavado individuales tienen valores más altos de HCP que los productos eluidos de los ensayos con los tampones de lavado combinados.

### 50 Ensayos con BI-MAb 1001b, un anticuerpo de la subclase IgG2

Los productos eluidos de los ensayos con los tampones de lavado individuales tienen valores más altos de HCP que los productos eluidos de los ensayos con los tampones de lavado combinados.

55 Los cuatro ensayos demuestran que la combinación de los cuatro aditivos cloruro sódico, PVP, isopropanol y arginina en un solo tampón de lavado es ventajosa frente al uso de tampones de lavado con aditivos individuales, en cuanto al contenido de proteínas de célula huésped (HCP) en el producto eluido.

60 El uso del tampón de lavado descrito demuestra asimismo que la turbidez del producto eluido disminuye claramente. También mejora el contenido de monómero y el rendimiento (BI-MAb 06a) o al menos quedan igual (BI-MAb 1003a).

Por tanto el tampón de lavado descrito es adecuado para mejorar el proceso de producción de proteínas. Mediante la introducción de la combinación de tampones de lavado se reducen las impurezas que de otro modo habría que eliminar con una etapa de purificación adicional.

65

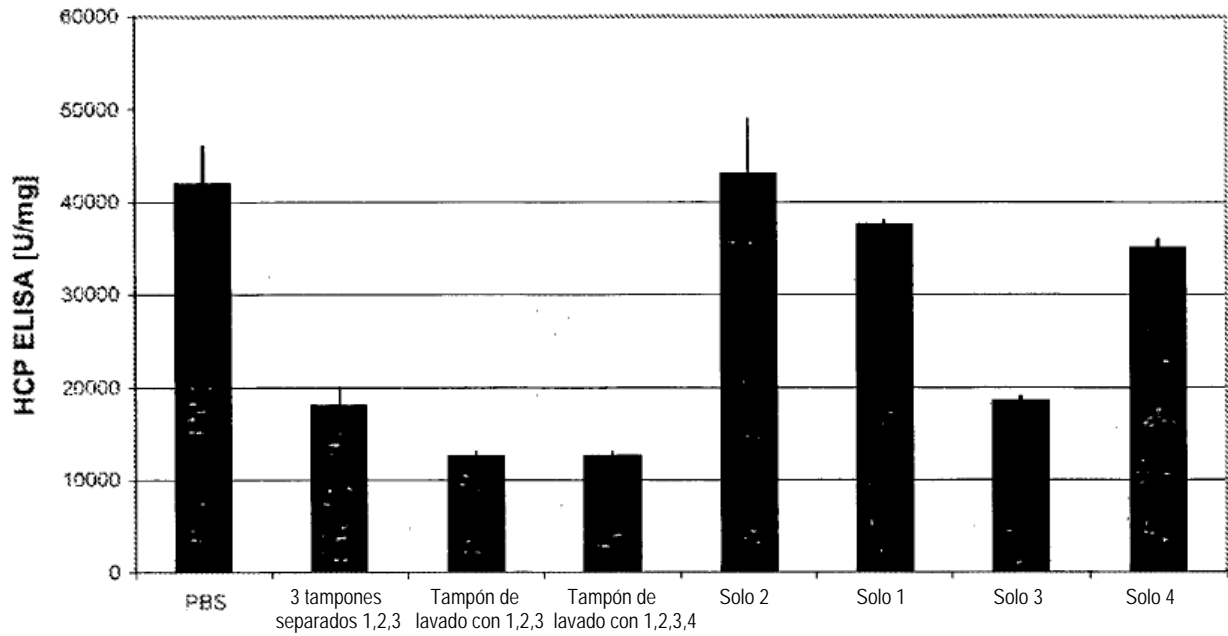
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para disminuir las impurezas de una composición que contiene una proteína con el dominio Fc de una inmunoglobulina (proteína buscada) mediante una cromatografía de proteína A que consta de las siguientes etapas:
- 10 a) uso de una fase móvil que contiene la proteína buscada sobre una fase estacionaria que lleva la proteína A, en unas condiciones en que la proteína buscada se fija a la fase estacionaria;
- 10 b) uso de un tampón de lavado con un pH comprendido entre 5 y 8 como fase móvil, que lleva como aditivos
- 10 i) arginina a una concentración de 0,1 - 1 mol/l,
- 10 ii) cloruro sódico a una concentración de 0,2 hasta 2 mol/l,
- 10 iii) un alcohol elegido del grupo formado por isopropanol, n-propanol y etanol a una concentración del 5 - 30% (p/v) y
- 15 iv) polivinilpirrolidona o un detergente a una concentración del 0,05 - 2% (p/v);
- 15 c) uso de un tampón de elución como fase móvil, en unas condiciones en que la proteína buscada es eluida de la fase estacionaria.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la concentración de arginina en el tampón de lavado es de 0,4 - 0,6 mol/l.
- 20 3. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la concentración de cloruro sódico en el tampón de lavado es de 0,9 - 1,1 mol/l.
- 25 4. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el alcohol del tampón de lavado es isopropanol a una concentración del 10 - 20% (p/v).
- 25 5. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la polivinilpirrolidona (PVP) está a una concentración del 0,1 - 2% (p/v).
- 30 6. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el detergente es un polioxietileno-sorbitán-monolaurato a una concentración del 0,05 - 2% (p/v).
- 35 7. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las impurezas son proteínas de la célula huésped (HCP).
- 35 8. Tampón de lavado para la cromatografía de afinidad, con un pH de 5 hasta 8, que contiene
- 40 i) arginina a una concentración de 0,1 - 1 mol/l,
- 40 ii) cloruro sódico a una concentración de 0,2 hasta 2 mol/l,
- 40 iii) un alcohol elegido del grupo formado por isopropanol, n-propanol y etanol a una concentración del 5 - 30% (p/v) y
- 40 iv) polivinilpirrolidona o un detergente a una concentración del 0,05 - 2% (p/v).



Figura 1a

Reducción de HCP mediante distintos tampones de lavado  
(BI-MAb 06a)



**Figura 1b**

**Rendimientos en el producto eluido tras distintos tampones de lavado  
(BI-MAb 06a)**

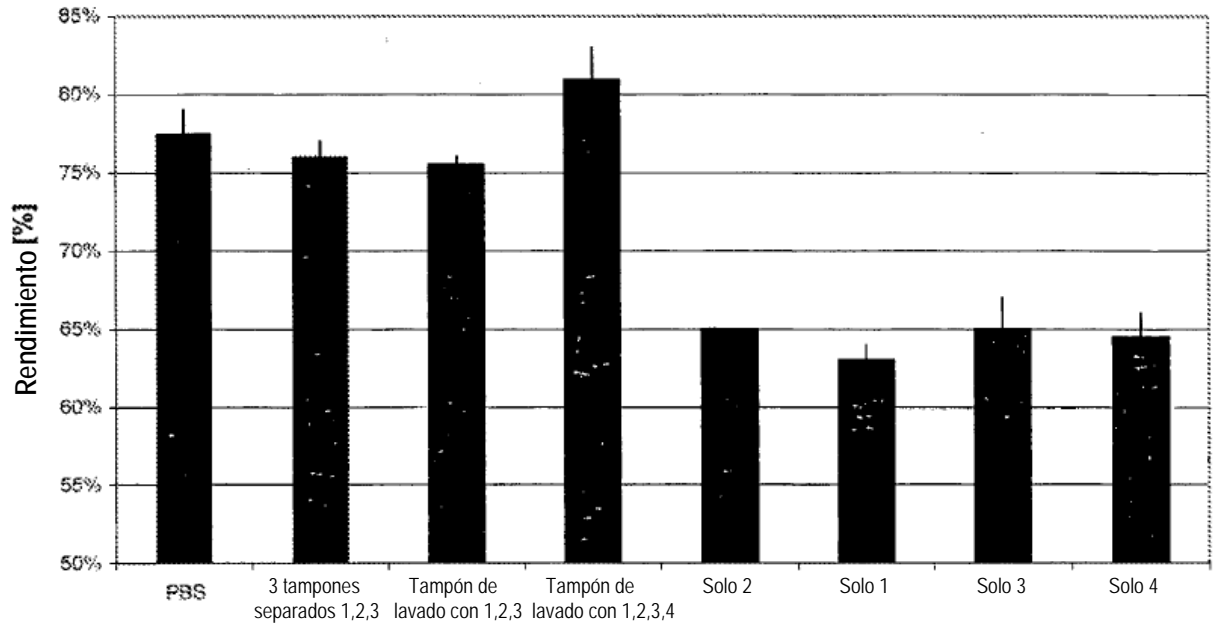


Figura 1c

Turbidez en el producto eluido tras distintos tampones de lavado

(BI-MAb 06a)

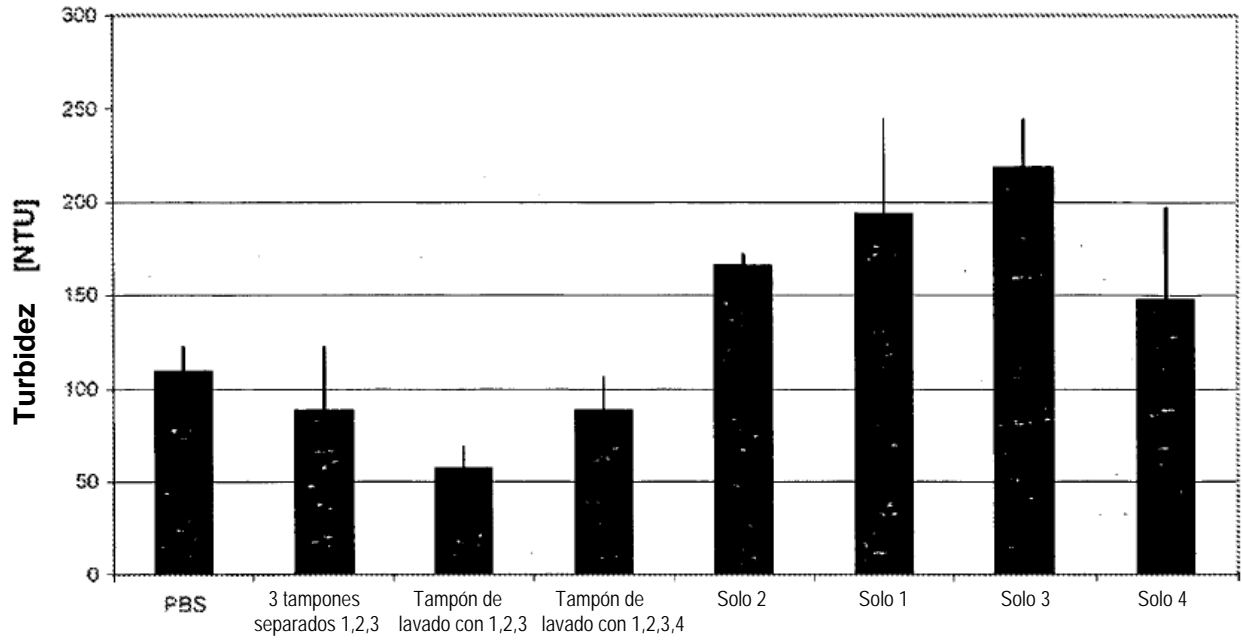
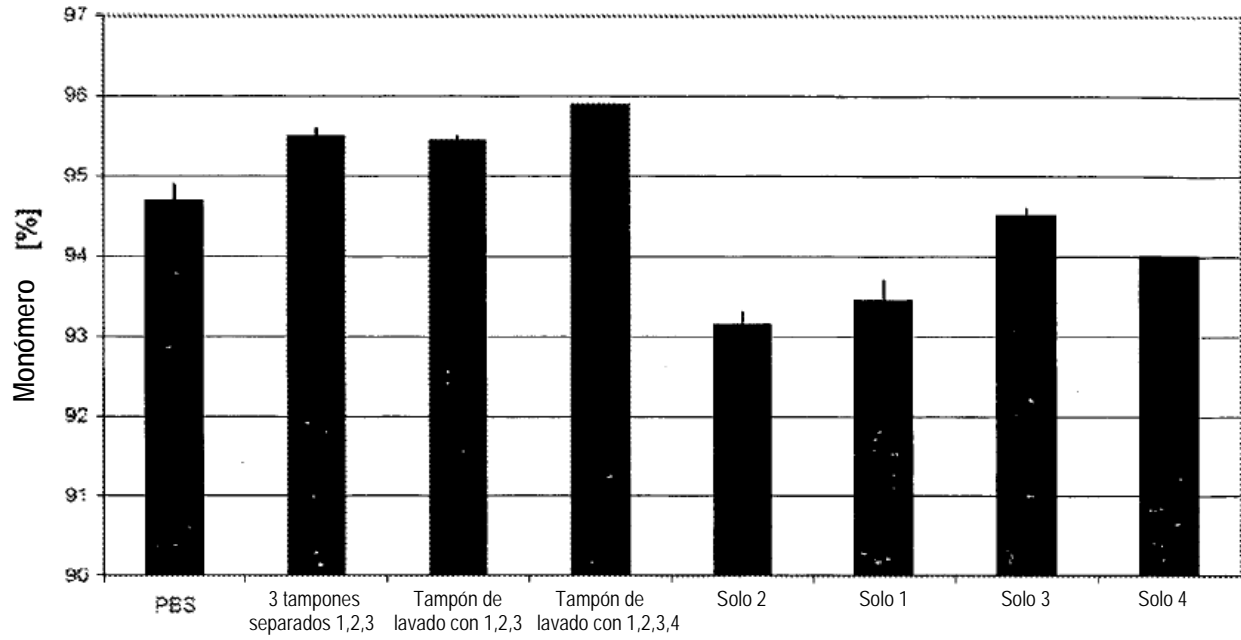


Figura 1d

Contenido de monómero en el producto eluido tras distintos tampones de lavado  
(BI-MAb 06a)



**Figura 2a**

**Turbidez del producto eluido tras distintos tampones de lavado**

**(BI-MAb 1003a)**

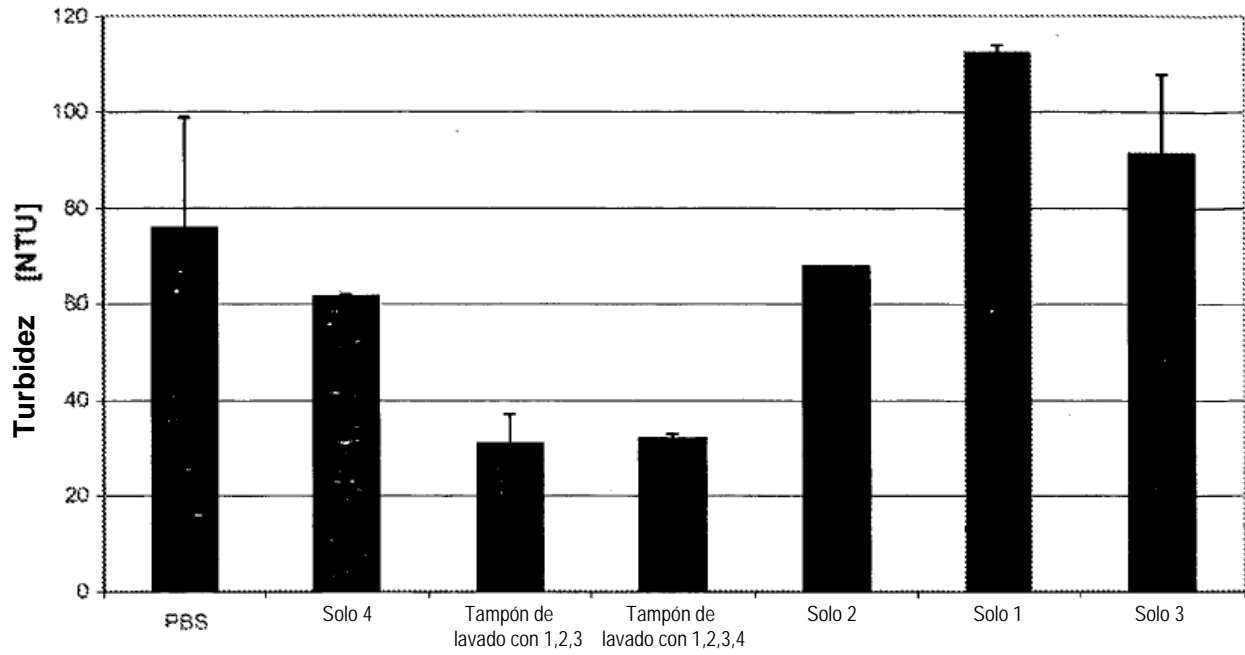


Figura 2b

Reducción de HCP mediante distintos tampones de lavado  
(BI-MAb 1003a)

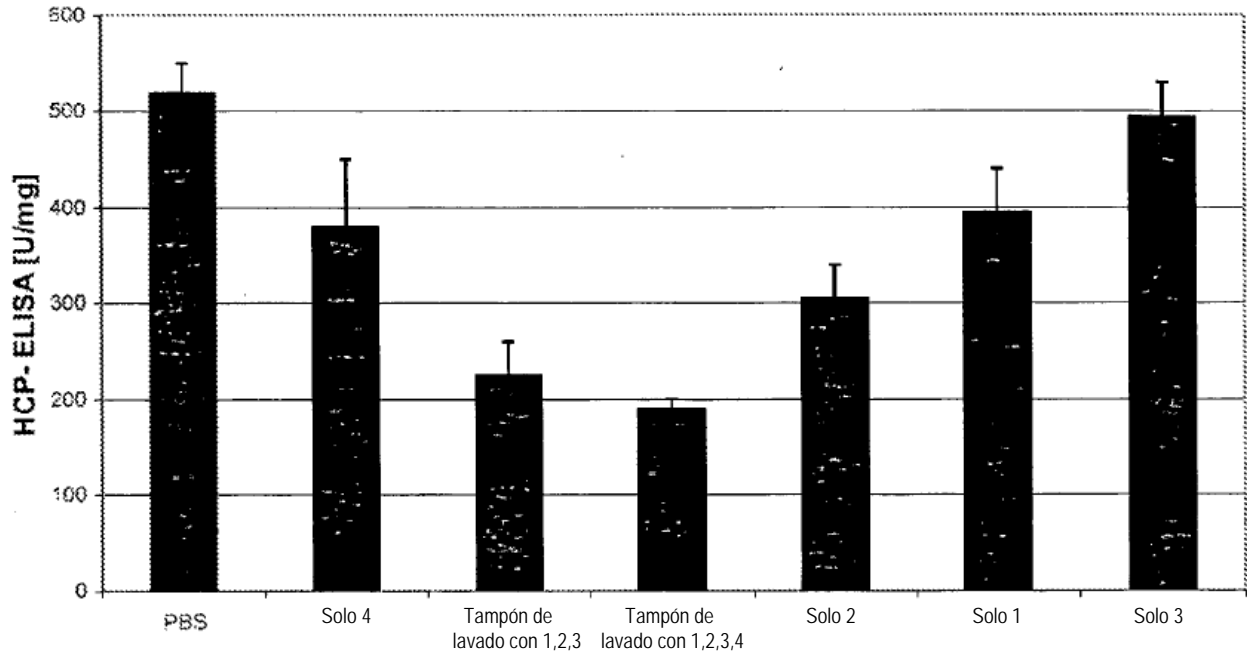


Figura 2c

Contenido de monómero del producto eluido tras distintos tampones de lavado  
(BI-MAb 1003a)

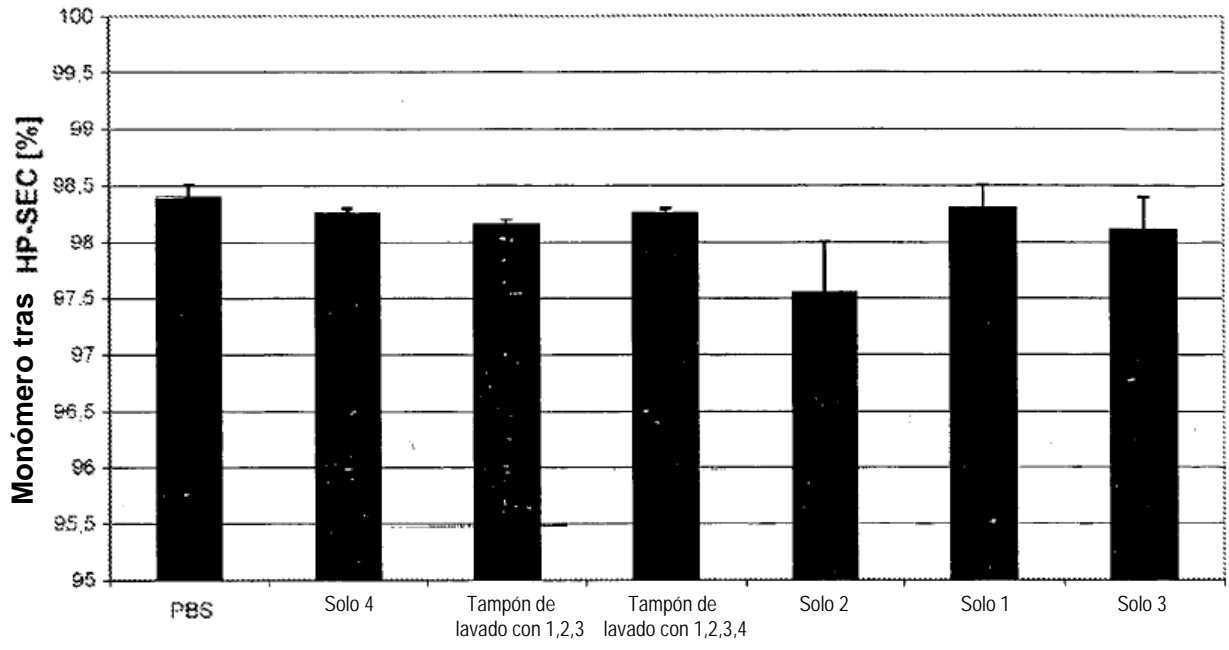


Figura 2d

Rendimiento tras distintos tampones de lavado  
(BI-MAb 1003a)

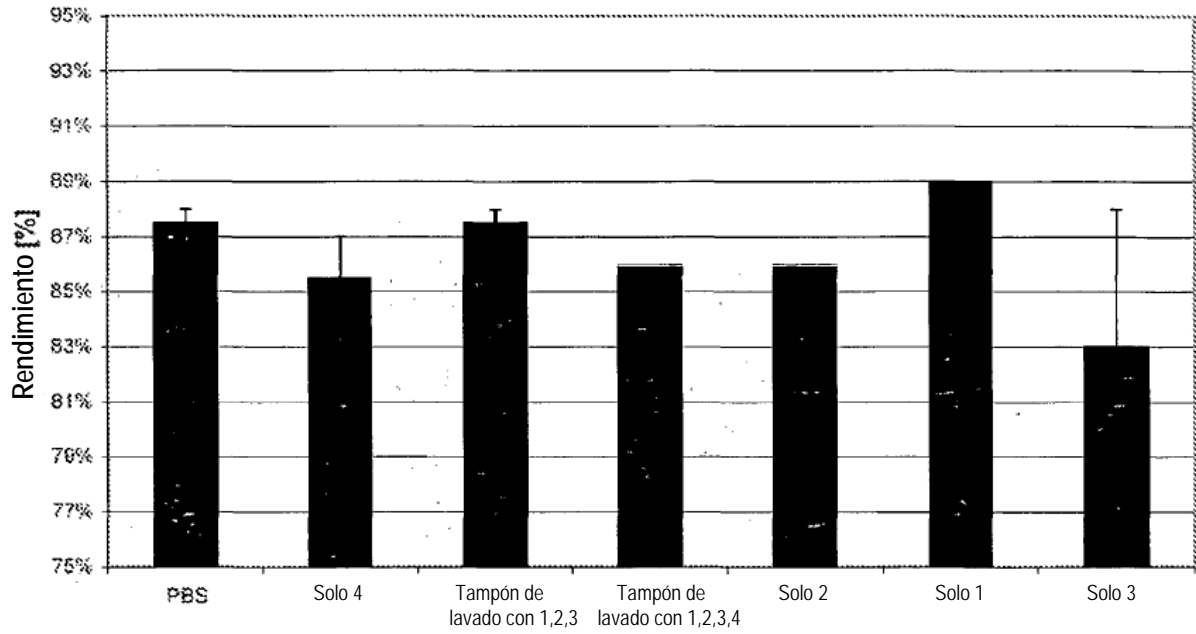
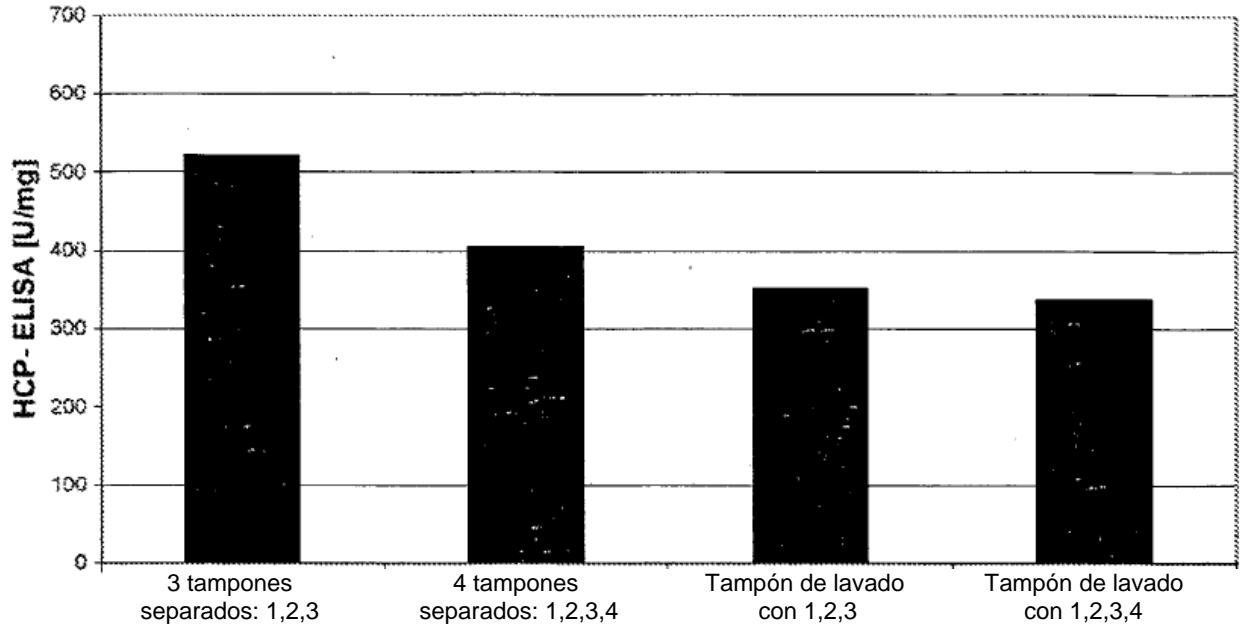




Figura 3

Reducción de HCP mediante distintos tampones de lavado

(BI-MAb 07c)



**Figura 4**

**Reducción de HCP mediante distintos tampones de lavado  
(BI-MAb 1001b)**

