

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 446**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

B01D 15/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2004 E 10174366 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2336172**

54 Título: **Retirada de agregados de alto peso molecular usando cromatografía de hidroxapatita**

30 Prioridad:

27.10.2003 US 514018 P

20.11.2003 US 523335 P

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

02.03.2015

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755 , US**

72 Inventor/es:

**SUN, SHUJUN;
GALLO, CHRISTOPHER y
KELLEY, BRIAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 530 446 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

Retirada de agregados de alto peso molecular usando cromatografía de hidroxiapatita

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos de retirada de agregados de alto peso molecular de una preparación de anticuerpo usando cromatografía de hidroxiapatita. En ciertas realizaciones de la presente invención, se puede reducir considerablemente la cantidad de agregados de alto peso molecular presente en la preparación final, tal como desde un 40 % a menos de un 1 %.

Antecedentes de la invención

10 Es deseable identificar procedimientos útiles de purificación de proteínas que no destruyan, ni reduzcan considerablemente, la actividad biológica de la proteína. Se deben retirar los contaminantes de las preparaciones de anticuerpo antes de que se puedan usar en aplicaciones de diagnóstico, aplicaciones terapéuticas, biología celular aplicada, y estudios funcionales. Las preparaciones de anticuerpo recolectadas de líneas celulares de hibridoma, por ejemplo, contienen a menudo componentes no deseados, tales como agregados de alto peso molecular (HMWA) del anticuerpo producido por la línea celular. Esta formación de agregados puede afectar negativamente a la seguridad del producto al causar activación del complemento o anafilaxis tras su administración. Además, la formación del agregado puede dificultar el procedimiento de fabricación al causar descenso del rendimiento de producto, ampliación del pico, y pérdida de actividad.

20 Los procedimientos de purificación de proteínas más comunes se basan en las diferencias de tamaño, carga, y solubilidad entre la proteína que se va a purificar y los contaminantes. Los protocolos basados en estos parámetros incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, y cromatografía de interacción hidrofóbica. Estos procedimientos cromatográficos, sin embargo, presentan en ocasiones dificultades técnicas en la separación de agregados o de especies multiméricas de anticuerpos. Técnicas tales como la cromatografía de intercambio iónico y de interacción hidrofóbica, por ejemplo, pueden inducir la formación de agregados debido a un aumento de la concentración de proteínas o de los cambios requeridos en la concentración y/o el pH del tampón durante la elución. Además, en algunos casos los anticuerpos muestran diferencias en los puntos isoeléctricos que son demasiado pequeñas para permitir su separación mediante cromatografía de intercambio iónico. Tarditi, J. Immunol. Methods 599:13-20 (1992). La cromatografía de exclusión por tamaño es incómoda y da como resultado una dilución considerable del producto, que es un impedimento en los procedimientos de fabricación a gran escala basados en la eficacia. También se puede producir fuga de ligandos de las columnas de cromatografía de afinidad, lo que da como resultado la contaminación no deseada del producto eluido. Steindl, J. Immunol. Methods 235:61-69 (2000). Los solicitantes intentaron retirar HMWA de una preparación de anticuerpo anti-GDF-8 usando cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, así como cromatografía de interacción hidrofóbica. Sin embargo, todos estos procedimientos fueron incapaces de retirar considerablemente HMWA de la preparación de anticuerpo anti-GDF-8.

35 La cromatografía de hidroxiapatita es un procedimiento de purificación de proteínas que usa fosfato de calcio hidroxilado insoluble

40 $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, que forma tanto la matriz como el ligando. Los grupos funcionales consisten en pares de iones calcio cargados positivamente (sitios C) y agrupaciones de grupos fosfato cargados negativamente (sitios P). Las interacciones entre la hidroxiapatita y las proteínas son complejas y multimodales. En un procedimiento de interacción, sin embargo, los grupos amino de las proteínas cargados positivamente se asocian con los sitios P cargados negativamente y los grupos carboxilo de las proteínas interaccionan por complejación de coordinación con los sitios C. Shepard, J. of Chromatography 891:93-98 (2000).

45 La hidroxiapatita cristalina fue el primer tipo de hidroxiapatita usado en cromatografía, pero estaba limitada por dificultades estructurales. La cromatografía de hidroxiapatita cerámica (cHA) se desarrolló para superar algunas de las dificultades asociadas a la hidroxiapatita cristalina, tales como los caudales limitados. La hidroxiapatita cerámica posee alta durabilidad, buena capacidad de unión a proteínas, y se puede usar con caudales y presiones mayores que la hidroxiapatita cristalina. Vola y col., BioTechniques 14:650-655 (1993).

50 La hidroxiapatita se ha usado en la separación cromatográfica de proteínas, ácidos nucleicos, así como anticuerpos. En la cromatografía de hidroxiapatita, la columna se equilibra normalmente, y la muestra se aplica en una baja concentración de tampón fosfato y las proteínas adsorbidas se eluyen a continuación en un gradiente de concentración de tampón fosfato. Giovannini, Biotechnology and Bioengineering 73:522-529 (2000). En ocasiones, se usan con éxito bajos gradientes de fosfato sódico para eluir proteínas, mientras que en otros casos se han usado con éxito gradientes de concentración de fosfato sódico de hasta 400 mM. Véase, por ejemplo Stanker, J. Immunological Methods 76:157-169 (1985) (gradiente de elución de fosfato sódico de 10 mM a 30 mM); Shepard, J. Chromatography 891:93-98 (2000) (gradiente de elución de fosfato sódico de 10 mM a 74 mM); Tarditi, J. Chromatography 599:13-20 (1992) (gradiente de elución de fosfato sódico de 10 mM a 350 mM). Mientras que se han incorporado sales tales como NaCl en el tampón de unión para purificar un anticuerpo usando cromatografía de hidroxiapatita, Giovannini, R. Biotechnology and Bioengineering 73:522-529 (2000), no se conocía que sales tales

como NaCl y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ afectaran a la elución de las proteínas en cromatografía de hidroxiapatita. Karlsson y col., Ion Exchange Chromatography, en Protein Purification, VCH Publishers, Inc. (Janson y Ryden eds., 1989).

5 En algunos casos, los investigadores han sido incapaces de eluir selectivamente anticuerpos a partir de hidroxiapatita o descubrieron que la cromatografía de hidroxiapatita no daba como resultado un producto lo
suficientemente puro. Junbauer, J. Chromatography 476: 257-268 (1989); Giovannini, Biotechnology and
10 Bioengineering 73:522-529 (2000). Los solicitantes intentaron separar sin éxito agregados de alto peso molecular de una preparación de anticuerpo usando cromatografía de hidroxiapatita cerámica y una elución de fosfato sódico basada en las enseñanzas de la técnica anterior (Figura 1). Además, se sabe que las condiciones de elución severas, cuando se usan en un intento de romper la fuerte unión de una proteína a una matriz, destruye en la
15 actividad biológica de la proteína. Por lo tanto, existe la necesidad de procedimientos eficientes para la retirada de impurezas, tales como agregados de alto peso molecular, de preparaciones de anticuerpo, que no destruyan la actividad biológica de los anticuerpos.

Sumario de la invención

15 Los solicitantes descubrieron sorprendentemente que se puede usar NaCl en un nuevo procedimiento de cromatografía de hidroxiapatita para la purificación de inmunoglobulinas y la retirada de HMWA de diferentes materiales de partida (Figura 2). Por lo tanto, la presente invención se refiere a procedimientos para la retirada de agregados de alto peso molecular de preparaciones de anticuerpo poniendo en contacto dicha preparación con una resina de hidroxiapatita y eluyendo selectivamente el anticuerpo de la resina. Además se desvela un método en el
20 que la preparación de anticuerpo se puede intercambiar a un tampón de equilibrado y a continuación permitir que fluya a través de una resina de hidroxiapatita. Una combinación de estos procedimientos de cromatografía de hidroxiapatita de unión/flujo continuo también se puede usar para purificar preparaciones de anticuerpos.

La invención ofrece un tampón de elución que contiene fosfato sódico de 1 a 20 mM y NaCl de 0,2 a 2,5 M, en el que el tampón de elución tiene un pH de 6,4 a 7,6.

25 La invención presenta un tampón de equilibrado y tampón de lavado que contiene fosfato sódico de 1 a 20 mM, y NaCl de 0,01 a 2,0 M, arginina de 0 a 200 mM, y HEPES de 0 a 200 mM, en la que el tampón de equilibrio y tampón de lavado tienen un pH de 6,4 a 7,4

En una realización, el anticuerpo purificado contiene menos de un 5 % de agregados de alto peso molecular.

En una realización más, el anticuerpo purificado contiene menos de un 1 % de agregados de alto peso molecular.

30 En una realización adicional, la preparación de anticuerpo contiene al menos un anticuerpo IgG. Más específicamente, la preparación de anticuerpo contiene al menos un anticuerpo seleccionado entre anti-receptor de IL-21, anti-GDF-8, anti-Abeta, anti-CD22, anti-Lewis Y, anti-IL-13, o anti-IL-22.

35 Se puede usar al menos un procedimiento de purificación en combinación con la cromatografía de hidroxiapatita de la invención. Se podrían usar una diversidad de procedimientos de purificación, que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de Proteína A, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad de metal inmovilizado, cromatografía de exclusión por tamaño, diafiltración, ultrafiltración, filtración de retirada viral, cromatografía de intercambio aniónico, y/o cromatografía de intercambio catiónico.

40 En una realización, la cromatografía de intercambio aniónico y de Proteína A se usan en combinación con cromatografía de hidroxiapatita cerámica. La cromatografía de intercambio aniónico y de Proteína A se pueden usar en combinación, por ejemplo, poniendo en contacto la preparación de anticuerpo con un soporte de Proteína A, lo que permite que el anticuerpo se adsorba al soporte, lavando el soporte y el anticuerpo adsorbido con al menos un tampón de lavado de Proteína A, eluyendo el anticuerpo adsorbido con al menos un tampón de elución de Proteína A, poniendo en contacto la preparación con un soporte de intercambio iónico, lo que permite que el anticuerpo fluya a través del soporte, lavando al soporte con al menos un tampón de lavado de intercambio iónico, poniendo en
45 contacto el flujo continuo de intercambio iónico con una resina de hidroxiapatita, lo que permite que el flujo continuo se adsorba a la resina, lavando la resina con al menos un tampón de lavado de hidroxiapatita, y excluyendo el anticuerpo purificado de la resina con al menos un tampón de elución de hidroxiapatita.

50 En una realización más, se pueden usar en combinación cromatografía de intercambio aniónico y de Proteína A, por ejemplo, poniendo en contacto la preparación con un soporte de Proteína A, permitiendo que el anticuerpo se adsorba en el soporte de Proteína A, lavando el soporte de Proteína A y el anticuerpo adsorbido con al menos un tampón de lavado de Proteína A, eluyendo el anticuerpo adsorbido con al menos un tampón de elución de Proteína A, poniendo en contacto el eluato de Proteína A con un soporte de intercambio iónico, permitiendo que el anticuerpo fluya a través del soporte de intercambio iónico, lavando el soporte de intercambio iónico con al menos un tampón de lavado de intercambio iónico, intercambiando el flujo continuo de intercambio iónico a un tampón de carga que comprende fosfato sódico de 1 a 20 mM y NaCl de 0,2 a 2,5 M, poniendo en contacto el flujo continuo de intercambio
55 iónico con una resina de hidroxiapatita, permitiendo que el anticuerpo fluya a través de la resina de hidroxiapatita, y lavando la resina de hidroxiapatita con al menos un tampón de lavado de hidroxiapatita.

Además, en otra realización, la cromatografía de intercambio iónico y de Proteína A se usan en combinación con cromatografía de hidroxiapatita cerámica. La cromatografía de intercambio aniónico y de Proteína A se pueden usar en combinación, por ejemplo, poniendo en contacto la preparación de anticuerpo con un soporte de Proteína A, lo que permite que el anticuerpo se adsorba al soporte, lavando el soporte y el anticuerpo adsorbido con al menos un tampón de lavado de Proteína A, eluyendo el anticuerpo adsorbido con al menos un tampón de elución de Proteína A, poniendo en contacto la preparación con un soporte de intercambio iónico, lo que permite que el anticuerpo fluya a través del soporte, lavando al soporte con al menos un tampón de lavado de intercambio iónico, poniendo en contacto el flujo continuo de intercambio iónico con una resina de hidroxiapatita, lo que permite que el flujo continuo se adsorba a la resina, lo que permite la unión de HMWA de forma más estrecha que el monómero de anticuerpos y, a medida que continúa la carga, desplazamiento del monómero unido por el HMWA, lavando la resina de hidroxiapatita con al menos un tampón de lavado de hidroxiapatita, y recogiendo el monómero de anticuerpo desplazado.

Los objetos y las ventajas adicionales de la invención se expondrán en parte en la descripción que sigue a continuación, y en parte serán evidentes a partir de la descripción, o se pueden aprender con la práctica de la invención. Los objetos y las ventajas de la invención se realizarán y lograrán por medio de los elementos y combinaciones particularmente señalados en las reivindicaciones anexas.

Se entenderá que tanto la descripción general precedente como la siguiente descripción detallada son únicamente ejemplares y aclaratorias y no son restrictivas de la invención reivindicada.

Los dibujos adjuntos, que se incorporan y componen parte de la presente memoria descriptiva, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 demuestra la incapacidad de la elución en gradiente de fosfato de la técnica anterior para separar HMWA de una preparación de anticuerpo anti GDF-8.

La Figura 2 demuestra que el uso de elución en gradiente de NaCl da como resultado la separación de una gran parte de los HMWA de una preparación de anticuerpo anti-GDF-8.

La Figura 3 muestra la separación de HMWA de una preparación de anticuerpo anti-CD22 usando cromatografía de cHA.

La Figura 4 muestra la separación de HMWA de una preparación de anticuerpo anti-Abeta usando cromatografía de cHA.

Descripción detallada de la invención

A. Definiciones

Para que la presente invención se pueda comprender con mayor facilidad, en primer lugar se definen ciertos términos. Se expondrán definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

El término "**anticuerpo**" se refiere a cualquier inmunoglobulina o fragmento de la misma, que incluye cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno. El término incluye, pero no se limita a, anticuerpo policlonal, monoclonal, monoespecífico, poliespecífico, no específico, humanizado, humano, de cadena sencilla, quimérico, sintético, recombinante, híbrido, mutado, injertado, y generado *in vitro*. El término "anticuerpo" también incluye fragmentos de anticuerpo tales como Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb, y otros fragmentos de anticuerpo que retienen la función de unión a antígeno. Por lo general, tales fragmentos deberían comprender un dominio de unión a antígeno.

También se pueden purificar mediante la invención anticuerpos que incluyen formas modificadas químicamente tales como por tratamiento con PEG, y proteínas de fusión que comprenden un resto de inmunoglobulina. El anticuerpo o fragmento del mismo se puede seleccionar entre cualquiera de los isotipos de anticuerpo conocidos y sus conformaciones, por ejemplo, IgA, IgG, IgD, IgE, monómeros de IgM, dímeros de IgA, trímeros de IgA, o pentámeros de IgM.

La expresión "**preparación de anticuerpo**" se refiere a cualquier composición que contiene un anticuerpo y/o componentes no deseados, tales como agregados de alto peso molecular de tales anticuerpos.

"**Hidroxiapatita cerámica**" o "**cHA**" se refiere a un fosfato de calcio hidroxilado insoluble de fórmula [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂], que se ha sinterizado a altas temperaturas en una forma cerámica macroporosa esférica. El término "cHA" incluye, pero no se limita a, hidroxiapatita cerámica de Tipo I y de Tipo II. A menos que se especifique lo contrario, "cHA" se refiere a cualquier tamaño de partícula que incluye, pero no se limita a, 20, 40, y 80 µm.

La expresión "**agregados de alto peso molecular**" o "**HMWA**" se refiere a una asociación de al menos dos anticuerpos. La asociación puede surgir de cualquier procedimiento que incluye, pero no se limita a, reticulación

covalente, no covalente, disulfuro, o no reducible. Los al menos dos anticuerpos pueden unirse a antígenos iguales o diferentes. Los al menos dos anticuerpos pueden estar en forma de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, u otras formas descritas en la definición anterior de "anticuerpo".

5 La expresión "**modo de flujo continuo**" se refiere a una técnica de separación de preparaciones de anticuerpo en la que se pretende que al menos un anticuerpo contenido en la preparación fluya a través de una resina o soporte cromatográfico, mientras que al menos un contaminante o impureza potencial se une a la resina o soporte cromatográfico. El modo de flujo continuo se puede usar, por ejemplo, en cromatografía de hidroxiapatita y en cromatografía de intercambio iónico.

10 "**Modo de unión**" se refiere a una técnica de separación de preparaciones de anticuerpo en la que al menos un anticuerpo contenido en la preparación se une a una resina o soporte cromatográfico, mientras que al menos un contaminante o impureza fluye a su través. El modo de unión se puede usar, por ejemplo, en cromatografía de hidroxiapatita y en cromatografía de intercambio iónico.

B. Descripción del procedimiento

15 La presente invención proporciona procedimientos para la retirada de agregados de alto peso molecular (HMWA) de preparaciones de anticuerpo usando cromatografía de hidroxiapatita en modo de unión. La presente invención tiene aplicación en la purificación de preparaciones de anticuerpo a gran escala.

20 En el modo de unión, el procedimiento usa un soporte de hidroxiapatita cargado con fosfato a pH neutro y fuerza iónica baja para unir tanto el anticuerpo como HMWA. A continuación, la columna se lava con un tampón de fosfato para retirar las impurezas unidas libremente. A continuación, el anticuerpo se eluye de forma selectiva usando un tampón de fosfato de fuerza iónica elevada que contiene NaCl de 0,2 a 2,5 M a pH de ligeramente ácido a ligeramente básico. A continuación, el HMWA se retira opcionalmente por lavado de la resina usando una fuerza iónica incluso más elevada y un tampón de de fosfato de concentración más elevada a pH neutro. Por último, la resina se regenera opcionalmente usando una solución de hidróxido sódico y fosfato potásico.

25 En modo de flujo continuo, se intercambia el tampón de una preparación de anticuerpo a un tampón de carga que contiene NaCl de 0,2 a 2,5 M con un pH ligeramente ácido o ligeramente básico. A continuación se permite que la preparación de anticuerpo fluya a través de una columna de hidroxiapatita, mientras que las impurezas tales como HMWA se unen a la columna. Opcionalmente, la columna se lava posteriormente para permitir que anticuerpos purificados adicionales fluyan a través de la columna. Por último, opcionalmente, la columna se puede separar y regenerar a continuación usando solución de hidróxido sódico y fosfato potásico.

30 En el modo de combinación de unión/flujo continuo, se permite que la preparación de anticuerpos fluya a través de una columna de hidroxiapatita, inicialmente tanto con monómero de anticuerpo como con unión de HMWA. Sin embargo, a medida que la carga continua, el HMWA entrante es capaz de unirse más fuertemente que el monómero de anticuerpo y por lo tanto desplaza el monómero unido. En consecuencia, el monómero desplazado fluye a través de la columna. Posteriormente la columna se lava opcionalmente para permitir que los anticuerpos desplazados fluyan a través de la columna. Por último, la columna se puede separar con una solución con alto contenido de sal, alto contenido de fosfato y a continuación se puede regenerar usando una solución de hidróxido sódico y fosfato potásico.

En una realización de la invención, el anticuerpo purificado contiene menos de un 5 % de HMWA, en una realización, menos de un 3 % de HMWA, y en otra realización, menos de un 1 % de HMWA.

40 1. Anticuerpos

45 Las preparaciones de anticuerpo de la invención se pueden aislar a partir de una diversidad de fuentes que incluyen, pero no se limitan a, suero de animales inmunizados, fluido ascítico, sobrenadantes de hibridoma o mieloma, medios condicionados derivados del cultivo de una línea celular recombinante que expresa la molécula de anticuerpo y de todos los extractos celulares de células de producción de anticuerpos. En una realización de la invención, se purifican anticuerpos de medios condicionados de cultivo celular de una diversidad de líneas celulares recombinantes de producción de anticuerpos. Aunque se puede esperar cierta variación de una línea celular a otra línea celular y entre los diversos productos de anticuerpo, en base a la divulgación del presente documento, se encuentra dentro del ámbito del experto habitual en esta materia adaptar la invención del presente documento a una combinación particular de proteína de anticuerpo y línea celular de producción.

50 Con fines únicamente ilustrativos, la presente invención se aplicó a la purificación de diversos anticuerpos del isotipo IgG y pl básico. De forma más específica, la presente invención se aplicó a los anticuerpos monoclonales frente a GDF-8 (en lo sucesivo en el presente documento "Myo-29"), los anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con el antígeno CD22 (en lo sucesivo en el presente documento "anti-CD22"), y los anticuerpos monoclonales frente al antígeno Abeta que se describen en el documento WO 02/46237 (en lo sucesivo en el presente documento "anti-Abeta"). La construcción de sistemas recombinantes para la producción de Myo-29 y los anticuerpos CD22 y Abeta se detallan en las solicitudes mencionadas anteriormente.

2. Resina de hidroxiapatita

Se dispone en el mercado de diversas resinas cromatográficas de hidroxiapatita, y se puede usar cualquier forma disponible del material en la práctica de la presente invención. En una realización de la invención, la hidroxiapatita está en forma cristalina. Las hidroxiapatitas para su uso en la presente invención pueden ser las que se aglomeran para formar partículas y se sinterizan a altas temperaturas en una masa cerámica porosa estable.

El tamaño de partícula de la hidroxiapatita puede variar ampliamente, pero un tamaño de partícula habitual varía de 1 μm a 1000 μm de diámetro, y puede ser de 10 μm a 100 μm . En una realización de la invención, el tamaño de partícula es de 20 μm . En otra realización de la invención, el tamaño de partícula es de 40 μm . En aún otra realización de la invención, el tamaño de partícula es de 80 μm .

Se pueden emplear una diversidad de soportes cromatográficos en la preparación de columnas de cHA, usándose con mayor frecuencia la hidroxiapatita de Tipo I y de Tipo II. El Tipo I tiene una alta capacidad de unión de proteínas y una mejor capacidad para proteínas ácidas. El Tipo II, sin embargo, tiene una menor capacidad de unión de proteínas, pero tiene mejor resolución de ácidos nucleicos y de ciertas proteínas. El material de Tipo II también tiene una afinidad muy baja por la albúmina y es especialmente adecuada para la purificación de numerosas especies y clases de inmunoglobulinas. La selección de un tipo de hidroxiapatita en particular se puede determinar por el experto en la materia.

La presente invención se puede usar con resina de hidroxiapatita que está empaquetada suelta en una columna, o en un cromatógrafo anual continuo. En una realización de la invención, la resina de hidroxiapatita cerámica se empaqueta en una columna. La selección de las dimensiones de la columna se puede determinar por el experto en la materia. En una realización de la invención, se puede usar un diámetro de columna de al menos 0,5 cm con una altura de lecho de aproximadamente 20 cm para la purificación a pequeña escala. En una realización adicional de la invención, se puede usar un diámetro de columna de aproximadamente 35 cm a aproximadamente 60 cm. En aún otra realización de la invención, se puede usar un diámetro de columna de 60 cm a 85 cm. En ciertas realizaciones del invención, se puede usar una suspensión de resina de hidroxiapatita cerámica en una solución 200 mM de Na_2HPO_4 a pH 9,0 para empaquetar la columna con un caudal constante de aproximadamente 4 cm/min o por acción de la gravedad.

2. Composiciones de tampón y condiciones de carga

Antes de poner en contacto la resina de hidroxiapatita con la preparación de anticuerpo, puede ser necesario ajustar parámetros tales como pH, fuerza iónica, y temperatura y en algunos casos la adición de sustancias de diferentes tipos. Por lo tanto, es una etapa opcional realizar un equilibrado de la matriz de hidroxiapatita por lavado con una solución (por ejemplo, un tampón para el ajuste de pH, fuerza iónica, etc., o para la introducción de un detergente) que proporciona las características necesarias para la purificación de la preparación de anticuerpo.

En una combinación de cromatografía de hidroxiapatita en modo unión/flujo continuo, la matriz de hidroxiapatita se equilibra y se lava con una solución, proporcionando de ese modo las características necesarias para la purificación de la preparación de anticuerpo. En una realización de la invención, la matriz se puede equilibrar usando una solución que contiene NaCl de 0,01 a 0,02 M a pH de ligeramente básico a ligeramente ácido. Por ejemplo, el tampón de equilibrado puede contener fosfato sódico de 1 a 20 mM, en otra realización puede contener fosfato sódico de 1 a 10 mM, en otra realización puede contener fosfato sódico de 2 a 5 mM, en otra realización puede contener fosfato sódico 2 mM, y en otra realización puede contener fosfato sódico 5 mM. El pH del tampón de carga puede variar de 6,2 a 8,0. En una realización, el pH puede ser de 6,6 a 7,7, y en otra realización el pH puede ser 7,3. El tampón de equilibrado puede contener arginina de 0 a 200 mM, en otra realización puede contener arginina 120 mM, y en otra realización puede contener arginina 100 mM. El tampón de equilibrado puede contener HEPES de 0 a 200 mM, en otra realización puede contener HEPES 20 mM, y en otra realización puede contener HEPES 100 mM.

También se puede intercambiar el tampón de la preparación de anticuerpo a un tampón apropiado o a un tampón de carga en la preparación para cromatografía de hidroxiapatita en modo de flujo continuo. En una realización de la divulgación, se puede intercambiar el tampón de la preparación de anticuerpo a un tampón de carga que contiene NaCl de 0,2 a 2,5 M a un pH de ligeramente ácido a ligeramente básico. Por ejemplo, el tampón de carga puede contener fosfato sódico de 1 a 20 mM, en otra realización puede contener fosfato sódico de 2 a 8 mM, en otra realización puede contener fosfato sódico de 3 a 7 mM, y en otra realización puede contener fosfato sódico 5 mM. El tampón de carga puede contener NaCl de 0,2 a 2,5 M, en una realización NaCl de 0,2 a 1,5 M, en otra realización, NaCl de 0,3 a 1,0 M, y en otra realización, NaCl 350 mM. El pH del tampón de carga puede variar de 6,4 a 7,6. En una realización el pH puede ser de 6,5 a 7,0, y en otra realización el pH puede ser 6,8.

El contacto de una preparación de anticuerpo con la resina de hidroxiapatita en modo de unión, modo de flujo continuo, o combinaciones de los mismos se puede realizar en una columna de lecho empaquetado, en una columna de lecho fluido/expandido que contiene la matriz de fase sólida, y/o en una operación discontinua sencilla en la que la matriz de fase sólida se mezcla con la solución durante un tiempo determinado.

Después de poner en contacto la resina de hidroxiapatita con la preparación de anticuerpo se realiza opcionalmente un procedimiento de lavado. Sin embargo, en algunos casos en los que no es crítica una muy alta pureza de la

inmunoglobulina o no se requiere un anticuerpo adicional en flujo continuo, se puede omitir el procedimiento de lavado, ahorrando una etapa del procedimiento así como solución de lavado. Los tampones de lavado empleados dependerán de la naturaleza de la resina de hidroxiapatita, del modo de cromatografía de hidroxiapatita que se vaya a emplear, y por lo tanto se pueden determinar por un experto habitual en la materia. En modo de flujo continuo y modo de combinación de unión/flujo continuo, el flujo continuo de anticuerpo purificado obtenido después de un lavado opcional de la columna se puede mezclar con otras fracciones de anticuerpo purificado.

En el modo de unión, el anticuerpo se puede eluir de la columna después de un procedimiento de lavado opcional. Para la elución del anticuerpo desde la columna, la presente invención usa un tampón de fosfato de fuerza iónica elevada que contiene NaCl de aproximadamente 0,2 a 2,5 M a pH de ligeramente ácido a ligeramente básico. Por ejemplo, el tampón de elución puede contener fosfato sódico de 1 a 20 mM, en otra realización puede contener fosfato sódico de 2 a 8 mM, en otra realización puede contener fosfato sódico de 2 a 6 mM, en otra realización puede contener fosfato sódico 3 mM, y en otra realización puede contener fosfato sódico 5 mM. El tampón de elución puede contener NaCl de 0,2 a 2,5 M, en una realización, NaCl de 0,2 a 1,5 M, en otra realización, NaCl de 0,3 a 1,1 M, en otra realización, NaCl 1,0 M, y en otra realización, NaCl 0,35 M. el pH del tampón de elución puede variar de 6,4 a 7,6. En una realización, el pH puede ser de 6,5 a 7,3, en otra realización el pH puede ser 7,2, y en otra realización el pH puede ser 6,8. El tampón de elución se puede alterar para la elución del anticuerpo de la columna en un gradiente continuo o discontinuo.

Tanto en el modo de unión, modo discontinuo, y combinaciones de los mismos, una matriz de fase sólida se puede limpiar opcionalmente, es decir, separar y regenerar, después de la elución o del flujo continuo del anticuerpo. Este procedimiento se realiza por lo general a intervalos regulares para minimizar la acumulación de impurezas en la superficie de la fase sólida y/o para esterilizar la matriz para evitar la contaminación del producto con microorganismos.

Los componentes del tampón se pueden ajustar de acuerdo con el conocimiento del experto habitual en la materia. En la Tabla 1, Tabla 2, y Tabla 3, respectivamente se proporcionan intervalos y ejemplos de la composición del tampón de muestra para modo de unión, el modo de flujo continuo, y modo de combinación de unión/flujo continuo. No todos los tampones o etapas son necesarios, sino que se proporcionan únicamente con fines ilustrativos. Por ejemplo, puede que no sea necesario tener dos etapas de equilibrado distintas y puede que no sea necesario separar, regenerar, o almacenar la resina de hidroxiapatita. Se puede usar un análisis sistemático de alto rendimiento, como se describe en el Ejemplo 11, para optimizar de forma eficaz las condiciones del tampón para la cromatografía en columna de cHA.

Tabla 1. Ejemplo de intervalos de composición de un tampón para el modo de unión

Tampón	Intervalo de la Composición	Composición o Composiciones de Ejemplo
Equilibrado 1	Fosfato Sódico de 10 mM a 500 mM NaCl 1,0 M pH de 6,4 a 7,4	Fosfato Sódico 0,3 M NaCl 1,0 M pH 6,8
Equilibrado 2	Fosfato Sódico de 1 a 20 mM NaCl de 0,2 a 2,5 M pH de 6,4 a 7,6	Fosfato Sódico 5,0 mM NaCl 50 mM pH 7,2
Lavado	Fosfato Sódico de 1 a 20 mM NaCl de 0 a 200 M pH de 6,4 a 7,4	Fosfato Sódico 5,0 mM NaCl 50 mM pH 7,2
Elución	Fosfato Sódico de 1 a 20 mM NaCl de 0,2 a 2,5 M pH de 6,4 a 7,6	Fosfato Sódico 5,0 mM NaCl 350 mM pH 6,8; o Fosfato Sódico 3,0 mM NaCl 1,0 M pH 7,2
Separación	Fosfato Sódico de 10 mM a 500 mM NaCl 1,0 M pH de 6,4 a 7,4	Fosfato sódico 0,3 M NaCl 1,0 M pH 6,8
Regeneración	Fosfato Potásico de 0,5 a 1,0 M NaOH 1,0 M	Fosfato Potásico 0,5 M NaOH 1,0 M

(continuación)

Tampón	Intervalo de la Composición	Composición o Composiciones de Ejemplo
Almacenamiento	NaOH de 10 a 50 mM	NaOH 20 mM

Tabla 2. Ejemplo de intervalos de composición de un tampón para el modo de flujo continuo

Tampón	Intervalo de la Composición	Composición de Ejemplo
Equilibrado 1	Fosfato Sódico de 10 mM a 500 mM NaCl 1,0 M pH de 6,4 a 7,4	Fosfato Sódico 0,3 M NaCl 1,0 M pH 6,8
Equilibrado 2	Fosfato Sódico de 1 a 20 mM NaCl de 0,2 a 2,5 M pH de 6,4 a 7,6	Fosfato Sódico 5,0 mM NaCl 350 mM pH 6,8
Tampón de carga	Fosfato Sódico de 1 a 20 mM NaCl de 0,2 a 2,5 M pH de 6,4 a 7,6	Fosfato Sódico 5,0 mM NaCl 350 mM pH 6,8
Lavado	Fosfato Sódico de 1 a 20 mM NaCl de 0,2 a 2,5 M pH de 6,4 a 7,6	Fosfato Sódico 5,0 mM NaCl 350 mM pH 6,8
Separación	Fosfato Sódico de 10 mM a 500 mM NaCl 1,0 M pH de 6,4 a 7,4	Fosfato sódico 0,3 M NaCl 1,0 M pH 6,8
Regeneración	Fosfato Potásico de 0,5 a 1,0 M NaOH 1,0 M	Fosfato Potásico 0,5 M NaOH 1,0 M
Almacenamiento	NaOH de 10 a 50 mM	NaOH 20 mM

Tabla 3. Ejemplo de intervalos de composición de un tampón para el modo de combinación de unión/flujo continuo

Tampón	Intervalo de la Composición	Composición o Composiciones de Ejemplo
Equilibrado 1	Fosfato Sódico de 10 mM a 500 mM NaCl 1,0 M pH de 6,4 a 7,4	Fosfato Sódico 0,3 M NaCl 1,0 M pH 6,8
Equilibrado 2	Fosfato Sódico de 1 a 20 mM NaCl de 0,01 a 2,0 M Arginina de 0 a 200 mM HEPES de 0 a 200 mM pH de 6,2 a 8,0	Fosfato Sódico 2,0 mM NaCl 50 mM, Arginina 100 mM HEPES 100 mM, pH 7,3; o Fosfato Sódico 5,0 mM NaCl 100 mM, Arginina 120 mM HEPES 20 mM, pH 7,3
Lavado	Fosfato Sódico de 1 a 20 mM NaCl de 0,01 a 2,0 M Arginina de 0 a 200 mM HEPES de 0 a 200 mM pH de 6,2 a 8,0	Fosfato Sódico 2,0 mM NaCl 50 mM, Arginina 100 mM HEPES 100 mM, pH 7,3; o Fosfato Sódico 5,0 mM NaCl 100 mM, Arginina 120 mM HEPES 20 mM, pH 7,3
Separación	Fosfato Sódico de 10 mM a 500 mM NaCl 1,0 M pH de 6,4 a 7,4	Fosfato sódico 0,3 M NaCl 1,0 M pH 6,8

(continuación)

Tampón	Intervalo de la Composición	Composición o Composiciones de Ejemplo
Regeneración	Fosfato Potásico de 0,5 a 1,0 M NaOH 1,0 M	Fosfato Potásico 0,5 M NaOH 1,0 M
Almacenamiento	NaOH de 10 a 50 mM	NaOH 20 mM

En una realización de la invención, la carga sobre la resina de cHA puede ser, por ejemplo, con una relación de carga ≤ 20 mg/ml y un nivel de partida de agregado en la carga ≤ 40 % de HMWA. En ciertas realizaciones de la invención, se puede usar una relación de carga de 1,8 a 10,4 mg/ml con un nivel de partida de agregado en la carga de aproximadamente un 15 %.

En una realización adicional de la invención, la resina de cHA se carga con una relación de carga de al menos 20 mg/ml y con un nivel de partida de agregado en la carga ≤ 40 % de HMWA. En ciertas realizaciones de la invención, se puede usar una relación de carga de 30 a 40 mg/ml con un nivel de partida de agregado en la carga de aproximadamente un 27 %.

3. Etapas opcionales adicionales

Aunque se ha descubierto que la cromatografía de hidroxapatita se puede usar sólo para separar IgG monomérica de agregados, como se ha mencionado anteriormente, se puede usar el procedimiento de purificación de la invención en combinación con otras técnicas de purificación de proteínas. En una realización de la invención, pueden ser deseables una o más etapas que precedan a la etapa de hidroxapatita para reducir la relación de carga de los contaminantes o impurezas. En otra realización de la invención, pueden ser deseables una o más etapas de purificación después de la etapa de hidroxapatita para retirar contaminantes o impurezas adicionales.

El procedimiento de purificación con cHA que se ha descrito se puede combinar opcionalmente con otras etapas de purificación, que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de Proteína A, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad de metal inmovilizado, cromatografía por exclusión de tamaño, diafiltración, ultrafiltración, filtración de retirada viral, y/o cromatografía de intercambio iónico.

En una realización, antes de la etapa de purificación con cHA, opcionalmente los medios de recolección se pueden purificar inicialmente mediante una etapa de cromatografía de Proteína A. Por ejemplo, se puede emplear de manera provechosa PROSEP-A™ (Millipore, U.K.), que consiste en Proteína A acoplada covalentemente a vidrio de poro controlado. Otras formulaciones útiles de Proteína A incluyen Proteína A Sepharose FAST FLOW™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), Proteína A TOYOPEARL™ 650M (TosoHaas Co., Philadelphia, PA), y columnas MABSELECT™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Como etapa opcional anterior a la purificación con cHA, se puede emplear cromatografía de intercambio iónico. A este respecto, se pueden unir diversos sustituyentes aniónicos o catiónicos a matrices para formar soportes aniónicos o catiónicos para cromatografía. Los sustituyentes de intercambio iónico incluyen grupos dietilaminoetilo (DEAE), trimetilaminoetil acrilamida (TMAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y amino cuaternario (Q). Los sustituyentes de intercambio catiónico incluyen carboximetilo (CM), sulfoetilo (SE), sulfopropilo (SP), fosfato (P) y sulfonato (S). Las resinas de intercambio iónico celulósicas tales como DE23, DE32, DE52, CM-23, CM-32 y CM-52 están disponibles en Whatman Ltd. Maidstone, Kent, U.K. También se conocen intercambiadores iónicos reticulados y basados en Sephadex. Por ejemplo, DEAE-, QAE-, CM-, y SP-Sephadex, y DEAE-, Q-, CM- y S-Sepharose, y Sepharose están todos disponibles en Amersham Biosciences, Piscataway, NJ. Además, los copolímeros de etilenglicol-metacrilato derivatizados tanto con DEAE como con CM tales como TOYOPEARL™ DEAE-650S o M y TOYOPEARL™ CM-650S o M están disponibles en Toso Haas Co., Philadelphia, PA.

En una realización de la invención, se puede usar cromatografía de intercambio iónico en modo de unión o en modo de flujo continuo.

En ciertas realizaciones, la etapa de cromatografía de Proteína A se realiza en primer lugar, la etapa de intercambio iónico se realiza en segundo lugar, y la etapa de cHA se realiza en tercer lugar.

4. Retirada de impurezas adicionales

Además de la retirada de HMWA, se ha mostrado que la cromatografía de cHA es útil para retirar otras impurezas de preparaciones de anticuerpos. Otras impurezas que se pueden retirar con los procedimientos de cromatografía de cHA de la invención incluyen, pero no se limitan a, ADN, proteína de célula huésped, virus inesperados, y contaminantes de Proteína A a partir de las etapas de purificación anteriores.

En una realización de la invención, la invención es capaz de retirar la Proteína A de la preparación de anticuerpos. En determinadas realizaciones de la presente invención, la cantidad de Proteína A presente en la preparación final se puede reducir de forma significativa, tal como de 300 ppm a menos de 1 ppm.

C. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines únicamente ilustrativos.

Ejemplo 1: Purificación de un Anticuerpo Anti-GDF-8

5 El procedimiento de purificación perfilado a continuación se desarrolló para un anticuerpo monoclonal anti-GDF-8 (denominado en el presente documento "Myo-29"). El anticuerpo Myo-29 es un anticuerpo del subtipo IgG1 y tiene un pI de aproximadamente 8,1. El procedimiento de purificación comprendió tres etapas cromatográficas (afinidad de Proteína A, intercambio aniónico, e hidroxapatita), una etapa de inactivación viral, y una etapa de ultrafiltración/diafiltración para concentrar e intercambiar el producto al tampón final. Todas las etapas se realizaron de 18 a 25 °C, excepto la etapa de cromatografía de Proteína A, que se realizó de 2 a 8 °C.

10 El procedimiento de purificación se puede normalizar para cualquier escala. Los caudales lineales listados son independientes del diámetro de columna y las proporciones de carga son en masa por unidad de volumen. La etapa de cromatografía de Proteína A se puede reciclar múltiples veces por proceso para acomodar cantidades variables de título de cultivo celular del biorreactor de recogida. Cada ciclo se considera una operación unitaria separada y la mezcla de elución se conserva para la siguiente etapa. La etapa de Proteína A tiene una capacidad de aproximadamente 35 gramos de Myo-29 por litro de MabSelect. Las etapas corriente abajo del procedimiento (por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de hidroxapatita cerámica) se escalan para acomodar aproximadamente 15 g de Myo-29 por litro de resina de intercambio aniónico y aproximadamente 10 g de Myo-29 por litro de resina de hidroxapatita cerámica.

1. Retirada de las células del cultivo

20 El anticuerpo Myo-29 se expresa en células de Ovario de Hamster Chino (CHO) y se hacen crecer en un biorreactor de tanque de 2500 l con agitación. Para recolectar el fluido de cultivo, las células se retiraron usando un dispositivo de microfiltración ProstaK (Millipore, Billerica, MA). Los medios condicionados clarificados (CCM) se recogieron para la primera etapa cromatográfica, la cromatografía de Proteína A.

2. Etapa de purificación de cromatografía de afinidad de Proteína A

25 Se equilibró una columna MabSelect de 17,7 l (30 cm de diámetro x 25 cm de altura) de resina de Proteína A recombinante (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) con 5 volúmenes de columna de un tampón de equilibrado (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5). Se aplicaron los CCM a la columna con un caudal de 2,5 cm/min y una relación de carga de 35 g de Myo-29 por litro de resina. Después de cargar la columna, se lavó con 5 volúmenes de columna de un tampón de lavado de salinidad elevada (Tris 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,5) y a continuación con 10 volúmenes de columna de un tampón de lavado de baja salinidad (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5). Se eluyó el Myo-29 aplicando 6 volúmenes de columna de un tampón de elución (Arginina 100 mM, NaCl 50 mM, pH 3,0). A continuación se mantuvo la mezcla de elución a un pH de $3,6 \pm 0,5$ durante $1,5 \pm 0,5$ horas como medida profiláctica para facilitar la inactivación de potenciales contaminantes víricos accidentales. A continuación se neutralizó la mezcla de elución a pH 7,3 con tampón HEPES 2 M a pH 8,0, para evitar la degradación de los restos ácidos lábiles del Myo-29.

Se monitorizaron los efluentes de la columna mediante diversos parámetros, incluyendo inspección visual de la absorbancia UV y de los perfiles cromatográficos de conductividad, y la recuperación de producto usando HPLC de Proteína A para el título de carga y absorbancia a 280 nm para la concentración de la mezcla de elución.

40 La columna se separó con Guanidina HCl 6 M y a continuación se lavó con tampón de lavado de separación (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5). La columna se almacenó en etanol al 16 %.

3. Etapa de purificación de cromatografía de intercambio aniónico

45 El eluato de la columna de Proteína A se purificó adicionalmente por cromatografía de intercambio aniónico en una columna de 75 l (80 cm de diámetro x 15 cm de longitud) de resina Q SEPHAROSE FF (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de un primer tampón de equilibrado (HEPES 20 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,3) y a continuación con 5 volúmenes de columna de un segundo tampón de equilibrado (Arginina 100 mM, NaCl 50 mM, HEPES 100 mM, pH 7,3). El eluato de la columna de Proteína A se aplicó a la columna equilibrada con un caudal de 2,5 cm/min y una proporción de carga de 15 gramos de Myo-29 por litro de resina. Después de la carga, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna del segundo tampón de equilibrado. Se recogió el flujo continuo de la columna de intercambio aniónico.

50 El flujo continuo recogido de la columna se monitorizó mediante varios parámetros, incluyendo la inspección visual de la absorbancia UV y de los perfiles cromatográficos de conductividad, y la recuperación de producto usando absorbancia a 280 nm.

La columna de intercambio aniónico se separó con tampón de separación (HEPES 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,3) y se regeneró con tampón de regeneración (NaOH 500 mM, NaCl 1 M, pH 13,3). La columna se almacenó en NaOH 0,01

M.

4. Filtración para retención de virus

El objetivo de esta etapa opcional fue la retirada de partículas de tipo retroviral que pudieran estar presentes en el cultivo celular de CHO y proporcionar seguridad adicional mediante la retirada de potenciales contaminantes víricos accidentales. Se recogió el flujo continuo de la columna de intercambio aniónico y se pasó a través de un filtro Planova de 35 nm de un solo uso (Asahi-Kasei Corp., New York, NY). El producto remanente del módulo se recuperó pasando tampón de lavado de la columna de intercambio aniónico (Arginina 100 mM, NaCl 50 mM, HEPES 100 mM, pH 7,3) a través del dispositivo.

La recuperación de producto después de la filtración para retención de virus se evaluó por absorbancia a 280 nm y análisis por SDS-PAGE de la mezcla de Planova en comparación con datos de rendimiento históricos.

5. Etapa de purificación de cromatografía de cHA

La solución de filtrado viral se purificó adicionalmente con una columna de hidroxiapatita (60 cm x 20 cm) empaquetada con resina de cHA de Tipo II, de tamaño de partícula de 40 µm (BioRad, Hercules, CA). La columna se equilibró con 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado 1 (fosfato sódico 0,3 M, NaCl 1,0 M, pH 6,8). Se realizó una segunda etapa de equilibrado con 4 volúmenes de columna de tampón de equilibrado 2 (fosfato sódico 5 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2). Los medios parcialmente purificados se cargaron sobre la resina en un tampón de carga 1:1 (v/v) (fosfato sódico 10 mM, pH 7,2) y con un caudal de 2,5 cm/min. La columna de cHA se lavó con 3 volúmenes de columna de un tampón de lavado (fosfato sódico 5 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2). El anticuerpo Myo-29 se eluyó de la resina de cHA usando 6 volúmenes de columna de un tampón de elución (fosfato sódico 5 mM, NaCl 350 mM, pH 6,8).

La etapa de purificación con cHA se controló por inspección visual de la absorbancia UV y de los perfiles cromatográficos de conductividad, la recuperación de producto por absorbancia a 280 nm, la retirada de HMWA como se determina mediante análisis de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), y la retirada de Proteína A como se determina mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima competitiva (ELISA).

La columna de cHA se separó con tampón de separación (fosfato sódico 0,3 M, NaCl 1,0 M, pH 6,8) y se regeneró con tampón de regeneración (fosfato potásico 0,5 M, NaOH 1,0 M, pH 13,3). La columna se almacenó en NaOH 0,02 M. La Tabla 4 demuestra que la cromatografía de cHA retira eficazmente las impurezas de HMWA de las preparaciones de anticuerpo. Además, la cromatografía de cHA es capaz de retirar otras impurezas, tales como Proteína A.

Tabla 4. Eliminación de HMWA y rendimientos de monómero de anticuerpo

Muestra	Carga de HMWA %	Pico de HMWA %	Carga de ProA (ppm)	Pico de ProA
1	14,6	1,0	17	BLOQ*
2	16,4	0,7	20	BLOQ
3	15,1	1,6	23	BLOQ
4	16,0	0,9	13	BLOQ

*BLOQ = Inferior al límite de cuantificación de 1 ng/ml.

30

6. Ultrafiltración/diafiltración y filtración final

La mezcla de elución de cHA se pasó a través de un sistema de ultrafiltración de flujo tangencial que usa módulos PLCTK Pellicon 2 (Millipore, Billerica, MA) compuesto por una membrana de celulosa regenerada compuesta con un límite nominal de peso molecular de 30.000. Los objetivos de esta etapa fueron concentrar e intercambiar el tampón de la mezcla de producto de cHA al tampón de formulación. La mezcla de producto de cHA se fijó con una solución al 50 % de sacarosa (p/v) para proporcionar una concentración de sacarosa al 2 %. El anticuerpo Myo-29 se concentró hasta aproximadamente 20 g/l, a continuación se diafiltró con aproximadamente ≥ 9 volúmenes de lavado de tampón de formulación (L-Histidina 0,01 M, Sacarosa al 2 %, pH 6,0). Tras completar la diafiltración, el producto se concentró adicionalmente hasta aproximadamente 60 g/l y se recuperó del aparato mediante vaciado por acción de la gravedad y extracción con aire seguido de aclarado abundante de los canales de retentato con tampón de formulación. El objetivo de concentración del Myo-29 en Sustancia Farmacológica es ≥ 35 g/l.

La sustancia farmacológica de Myo-29 se filtró finalmente a través de un filtro de 0,22 micrómetros, se equilibró con tampón de formulación (L-Histidina 0,01 M, Sacarosa al 2 %, pH 6,0), se tomaron alícuotas en frascos, y a continuación se almacenó a -80 °C.

45

Ejemplo 2: Purificación con cHA de una preparación de anticuerpo anti-GDF-8 usando resina de Tipo I

El anticuerpo Myo-29 también se purificó con éxito usando resina de cHA de Tipo I, de tamaño de partícula de 40 µM, empaquetada en una columna de 3,1 l. La columna se equilibró con 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado 1 (fosfato sódico 0,3 M, NaCl 1,0 M, pH 6,8). Se realizó una segunda etapa de equilibrado con 4 volúmenes de columna de tampón de equilibrado 2 (fosfato sódico 5 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2). Los medios parcialmente purificados de la etapa de purificación de intercambio aniónico se cargaron sobre la resina con una relación de carga de 35 mg/ml y con un caudal de 1,5 cm/min. La columna de cHA se lavó con 3 volúmenes de columna de un tampón de lavado (fosfato sódico 5 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2). El anticuerpo Myo-29 se eluyó de la resina de cHA usando 6 volúmenes de columna un tampón de elución (fosfato sódico 3 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,2).

La columna de cHA se separó con tampón de separación (fosfato sódico 0,3 M, NaCl 1,0 M, pH 6,8) y se regeneró con tampón de regeneración (fosfato potásico 0,5 M, NaOH 1,0 M, pH 13,3). La columna se almacenó en NaOH 0,02 M.

La etapa de purificación con cHA se controló por inspección visual de la absorbancia UV y de los perfiles cromatográficos de conductividad, la recuperación de producto por absorbancia a 280 nm, la retirada de HMWA como se determina mediante análisis de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), y la retirada de Proteína A como se determina mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima competitiva (ELISA). Como se muestra en la Tabla 5, la purificación con cHA usando resina de Tipo I fue capaz de disminuir el porcentaje de HMWA de un 27 % hasta un 0,9 % en el primer ciclo, y de una disminución adicional del porcentaje de HMWA hasta un 0,6 % en el segundo ciclo. Además, la resina de Tipo I se acomodó a una relación de carga mayor que la resina de Tipo II, mientras que aun así produjo suficiente rendimiento de monómero. Finalmente, la purificación con cHA usando resina de Tipo I es capaz de disminuir la cantidad de impurezas de Proteína A.

Tabla 5. Eliminación de HMWA y rendimientos de monómero de anticuerpo usando resina de Tipo I

Muestra	HMWA %	Rendimiento de monómero %	Proteína A (ppm)
Carga de cHA	27,0	N/A	169
Pico de cHA (ciclo N° 1)	0,9	86,6	BLOQ*
Pico de cHA (ciclo N° 2)	0,6	86,6	BLOQ

*BLOQ = Inferior al límite de cuantificación de 1 ng/ml.

Ejemplo 3: Purificación con cHA de una preparación de anticuerpo anti-CD22 y de una preparación de anticuerpo anti-Abeta usando resina de Tipo I

El procedimiento de purificación con cHA que se ha descrito en el Ejemplo 2 también fue capaz de retirar suficientemente HMWA tanto de una preparación de anticuerpo anti-CD22 como de una preparación de anticuerpo anti-Abeta. El procedimiento usado fue similar al que se ha descrito en el Ejemplo 2, con la excepción de que el monómero de anticuerpo purificado se eluyó en gradiente con 15 volúmenes de columna de tampón de elución (fosfato sódico 3 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,2).

Como se demuestra en la Tabla 6, la purificación con cHA usando resina de Tipo I fue capaz de disminuir los HMWA en la preparación de anticuerpo anti-CD22 hasta un 0,5 % y en la preparación de anticuerpo anti-Abeta por debajo del límite de detección. Además, la etapa de purificación con cHA fue capaz de retirar contaminantes de Proteína A de la preparación de anticuerpo.

Tabla 6. Eliminación de HMWA y rendimientos de monómero de anticuerpo usando resina de Tipo I en la purificación de preparaciones de anticuerpo anti-CD22 y anti-Abeta

Muestra	HMWA %	Rendimiento de monómero %	Proteína A (ppm)
Carga de Anti-CD22	3,7	N/A	30
Pico de Anti-CD22	0,5	87	BLOQ*
Carga de Anti-Abeta	1,87	N/A	40
Pico de Anti-Abeta	0,0	89	BLOQ

*BLOQ = Inferior al límite de cuantificación de 1 ng/ml.

Ejemplo 4: Purificación con cHA en modo de flujo continuo de un anticuerpo anti-GDF-8

El anticuerpo Myo-29 también se purificó con éxito usando un protocolo de purificación con cHA en modo de flujo continuo. Se empaquetó una columna Vantage de 1,6 x 20 cm (Millipore, Billerica, MA) en fosfato sódico dibásico 200 mM, pH 9,0, usando resina de Hidroxiapatita Cerámica Macro-Prep de Tipo II, de tamaño de partícula de 40 µm (BioRad, Hercules, CA). La columna se equilibró con 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado 1 (fosfato sódico 300 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,8) y 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado 2 (NaCl 350 mM, fosfato sódico 5 mM, pH 6,8). Se intercambió el tampón de la preparación de anticuerpo Myo-29 a un tampón de carga que contenía NaCl 350 mM, fosfato sódico 5 mM, pH 6,8 y a continuación se cargó en la columna de cHA. La columna se lavó con tampón de lavado (NaCl 350 mM, fosfato sódico 5 mM, pH 6,8), se separó con tampón de separación (fosfato sódico 300 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,8), y a continuación se regeneró con tampón de regeneración (fosfato potásico 500 mM, NaOH 1,0 M, pH 13,3). Todos los caudales se mantuvieron de 2,5 a 3 cm/min. Los efluentes de la columna se analizaron por SEC-HPLC usando un sistema de HPLC.

En la Tabla 7 se presenta un resumen de la recuperación de Myo-29 y de la retirada de HMWA de la preparación de anticuerpo. La preparación contenía inicialmente un 14,4 % de HMWA (carga), que se redujo a un 0,2 % de HMWA (flujo continuo) usando el procedimiento de purificación con cHA de la presente invención.

Tabla 7. Recuperación de Myo-29 y retirada de HMWA

Muestra	Recuperación de Myo-29 %	HMWA en la muestra %
Carga	N/A	14,4
Flujo continuo	79,6	0,2
Lavado	12,2	1,9
Post-lavado	1,5	5,6
Separación	10,3	84,3

Ejemplo 5: Purificación con cHA en modo de flujo continuo de un anticuerpo anti-GDF-8 usando resina de Tipo I

Se empaquetó una columna Vantage de 1,1 x 21 cm (Millipore, Billerica, MA) en fosfato sódico dibásico 200 mM, pH 9,0 usando resina de Hidroxiapatita Cerámica Macro-Prep de Tipo I, de tamaño de partícula de 40 µm (BioRad, Hercules, CA). La columna se equilibró con 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado 1 (fosfato sódico 300 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,8) y 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado 2 (NaCl 1,0 M, fosfato sódico 3 mM, pH 7,2). Se intercambió el tampón de la preparación de anticuerpo Myo-29 a un tampón de carga que contenía NaCl 1 M, fosfato sódico 3 mM, pH 7,2 y a continuación se cargó en la columna de cHA con una relación de carga de 26 mg/ml. La columna se lavó con tampón de lavado (NaCl 1,0 M, fosfato sódico 3 mM, pH 7,2), se separó con tampón de separación (fosfato sódico 300 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,8), y a continuación se regeneró con 5 volúmenes de columna de tampón de regeneración (fosfato potásico 500 mM, NaOH 1,0 M, pH 13,3). Todos los caudales se mantuvieron a menos de 90 cm/h para la carga y el lavado y a menos de 240 cm/h para el resto de procedimientos de purificación. Los efluentes de la columna se analizaron por SEC-HPLC usando un sistema de HPLC.

La preparación de anticuerpo contenía inicialmente un 27,2 % de HMWA (carga), que se redujo a un 6,1 % de HMWA (flujo continuo). Además, la recuperación del monómero de anticuerpo fue de un 72 %.

Ejemplo 6: Purificación con cHA de una preparación de anticuerpo anti-CD22

La purificación por cromatografía de HA cerámica también mostró ser útil en la purificación de una preparación de anticuerpo anti-CD22. Se empaquetó una columna Vantage de 1,6 x 20 cm (Millipore, Billerica, MA) en fosfato sódico dibásico 200 mM a pH 9,0 usando resina de Hidroxiapatita Cerámica Macro-Prep de Tipo II, de tamaño de partícula de 40 µm (BioRad, Hercules, CA). La columna se equilibró con 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado 1 (fosfato sódico 300 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,8) y 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado 2 (NaCl 50 mM, fosfato sódico 5 mM, pH 6,8). Se intercambió el tampón de la preparación de anticuerpo anti-CD22 a NaCl 50 mM, fosfato sódico 5 mM, pH 6,8 y a continuación se cargó en la columna de cHA. La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de tampón de lavado (NaCl 50 mM, fosfato sódico 5 mM, pH 6,8) y a continuación se eluyó en gradiente con fosfato sódico 5 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,8 con 15 volúmenes de columna. La columna se separó con tampón de separación (fosfato sódico 300 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,8), y a continuación se regeneró con tampón de regeneración (fosfato potásico 500 mM, NaOH 1,0 M). Todos los caudales se mantuvieron de 2,5 a 3 cm/min. Los efluentes de la columna se analizaron por SEC-HPLC usando un sistema de HPLC.

Como se muestra en la Figura 3, la purificación con cHA tuvo éxito en la retirada de HMWA de la preparación de anticuerpo anti-CD22. El porcentaje de HMWA en la carga fue de un 1,7 %, mientras que el porcentaje de HMWA en el eluato de cHA fue de un 0,0 %.

Ejemplo 7: Purificación con cHA de un anticuerpo Anti-Abeta

La purificación por cromatografía de HA cerámica también mostró ser útil en la purificación de una preparación de anticuerpo anti-Abeta. Se empaquetó una columna Vantage de 1,6 x 20 cm (Millipore) en fosfato sódico dibásico 200 mM a pH 9,0 usando resina de Hidroxiapatita Cerámica Macro-Prep de Tipo II, de tamaño de partícula de 40 µm (BioRad, Hercules, CA). La columna se equilibró con 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado 1 (fosfato sódico 300 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,8) y 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado 2 (NaCl 50 mM, fosfato sódico 5 mM, pH 6,8). Se intercambió el tampón de la preparación de anticuerpo anti-Abeta a NaCl 50 mM, fosfato sódico 5 mM, pH 6,8 y a continuación se cargó en la columna. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón de lavado (NaCl 50 mM, fosfato sódico 5 mM, pH 6,8) y a continuación se eluyó en gradiente con fosfato sódico 5 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,8 con 15 volúmenes de columna. La columna se separó con tampón de separación (fosfato sódico 300 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,8), y a continuación se regeneró con tampón de regeneración (fosfato potásico 500 mM, NaOH 1,0 M). Todos los caudales se mantuvieron de 2,5 a 3 cm/min. Los efluentes de la columna se analizaron por SEC-HPLC usando un sistema de HPLC.

Como se muestra en la Figura 4, la purificación con cHA tuvo éxito en la retirada de HMWA de la preparación de anticuerpo anti-Abeta. El porcentaje de HMWA en la carga fue de un 2,6 %, mientras que el porcentaje de HMWA en el eluato de cHA fue de un 0,0 %.

Ejemplo 8: Evaluación de la actividad de anticuerpo Myo-29 purificado

El anticuerpo anti-GDF-8 purificado de acuerdo con el procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 1, Myo-29, se ensayó para la actividad de unión usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima competitiva (ELISA). El ELISA competitivo se puede adaptar para el ensayo de la actividad de unión de otros anticuerpos purificados. Véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Land (eds.), 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Se adsorbió un receptor de GDF-8, ActRIIβ.Fc (2 µg/ml), sobre una placa de microtitulación de 96 pocillos con un volumen de 100 µl/pocillo. A continuación se incubó la placa de 2 a 8 °C durante una noche. La placa se lavó dos veces con tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, Tween 20 al 0,05 %) y se bloqueó con una solución al 4 % de albúmina de suero bovino (BSA) para minimizar la unión no específica. La placa se incubó a temperatura ambiente de 1,5 a 3,0 horas y se lavó dos veces con tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, Tween 20 al 0,05 %).

El patrón de referencia del anticuerpo Myo-29 se diluyó seriadamente 4 veces en diluyente de ensayo (BSA al 0,5 %, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM), dando como resultado un total de 8 puntos patrón. Las muestras de ensayo contenían fracciones de anticuerpo Myo-29 purificadas mediante una etapa de cromatografía de Proteína A así como fracciones purificadas después de una etapa de purificación con cHA adicional. Estas muestras de ensayo también se diluyeron seriadamente 2 veces en diluyente de ensayo dando como resultado 8 puntos que cayeron dentro del intervalo de la curva patrón. Los patrones y las muestras de ensayo se añadieron a los pocillos de ensayo apropiados a 50 µl/pocillo. A continuación se añadió el competidor biotinilado, GDF-8 marcado con biotina (50 ng/ml), a cada pocillo a 50 µl/pocillo. La placa se incubó durante una noche en un agitador de placas a temperatura ambiente.

La placa se lavó cuatro veces con tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, Tween 20 al 0,05 %) y se detectó la unión de GDF-8 marcado con biotina mediante la adición de 100 µl/pocillo de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (1:5.000; Southern Biotech, Birmingham, Alabama). La placa se incubó de 50 a 70 minutos en un agitador de placas a temperatura ambiente y a continuación se reveló por adición de 100 µl/pocillo de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (BioFX, Owings Mills, MD). La absorbancia de cada pocillo se determina a 450 nm con un lector de placas de ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La cantidad de Myo-29 activo en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la señal generada en el ensayo. La reacción se paró por adición de 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 0,18 M.

Se interpoló la concentración de Myo-29 capaz de unir GDF-8 biotinilado en las muestras de ensayo a partir de la curva patrón que se había ajustado usando una ecuación logística de 4 parámetros. A continuación se calculó el valor de bioactividad (% de proteína activa) de una muestra de ensayo dividiendo la concentración de proteína activa (determinada por ELISA) por la concentración total de proteína (determinada por A₂₈₀) y multiplicando esta proporción por 100. Si la misma muestra se purificó en procesos separados, se calcularon los promedios del valor de bioactividad. Los valores de bioactividad se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Actividad de unión de anticuerpo anti-GDF-8 (% de proteína activa)

Muestra	Purificación Post-Proteína A	Purificación Post-cHA
1	88	108
2	86	104
3	94	108

Como se demuestra en la Tabla 8, el Myo-29 retiene su capacidad para unir GDF-8 después de purificarse mediante el procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 1. La actividad de unión de Myo-29 purificado es algo inferior en el pico de fracciones eluidas en la purificación con Proteína A. Sin embargo, la actividad de unión excede el anticuerpo Myo-29 de referencia después de una etapa de purificación con cHA adicional como se ha descrito en el Ejemplo 1.

5 Ejemplo 9: Purificación con cHA por combinación de modo de unión/flujo continuo de un anticuerpo anti-GDF-8

La purificación por cromatografía de HA cerámica en una combinación de modo de unión/flujo continuo también mostró ser útil en la purificación de una preparación de anticuerpo anti-GDF-8. El experimento que se describe a continuación se ejecutó en un sistema ÄKTA FPLC (General Electric). Se empaquetó una columna Vantage de 1,1 x 21 cm (Millipore) en fosfato sódico dibásico 200 mM a pH 9,0 usando resina de Hidroxiapatita Cerámica Macro-Prep de Tipo II, de tamaño de partícula de 40 µm (BioRad, Hercules, CA). La columna se equilibró con 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado 1 (fosfato sódico 300 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,8) y 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado 2 (NaCl 50 mM, fosfato sódico 2,0 mM, arginina 100 mM, HEPES 100 mM, pH 7,3). Se cargó una preparación de anticuerpo anti-GDF-8 en la columna con una relación de carga de 20 mg/ml. La columna se lavó con tampón de equilibrado 2, se separó con tampón de separación (fosfato sódico 300 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,8), y a continuación se regeneró con tampón de regeneración (fosfato potásico 500 mM, NaOH 1,0 M, pH 13,3). El caudal para la carga y el lavado fue de 1,5 cm/min. Los caudales para el resto de los procedimientos de purificación se mantuvieron de 2,5 a 3,0 cm/min. Los efluentes de la columna se analizaron por SEC-HPLC usando un sistema de HPLC.

Los resultados demostraron que la operación de la resina de cHA de Tipo II en la combinación de modo de unión/flujo continuo es eficaz para la retirada de HMWA de preparaciones de anticuerpo. La preparación contenía inicialmente un 27 % de HMWA (carga), que se redujo a un 1,1 % de HMWA (flujo continuo) usando el procedimiento de purificación con cHA de la invención.

25 Ejemplo 10: Purificación con cHA por combinación de modo de unión/flujo continuo de un anticuerpo anti-GDF-8 usando resina de Tipo I

Se repitió el procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 9 usando resina de cHA de Tipo I en lugar de resina de cHA de Tipo II. Las condiciones de los tampones fueron idénticas a las usadas en el Ejemplo 9, con la excepción del tampón de equilibrado 2, que estaba compuesto por fosfato sódico 5,0 mM, NaCl 100 mM, Arginina 120 mM, HEPES 20 mM, a un pH de 7,3.

30 Como se muestra en la Tabla 9, la operación de la resina de cHA de Tipo I en la combinación de modo de unión/flujo continuo es eficaz para la retirada de HMWA de preparaciones de anticuerpo mientras que mantiene los rendimientos de monómero de anticuerpo. Además, la combinación de modo de unión/flujo continuo es eficaz para la retirada de impurezas de Proteína A. Finalmente, la resina de cHA de Tipo I permitió un aumento de la relación de carga de 55 mg/ml.

Tabla 9. Eliminación de HMWA y rendimientos de monómero de anticuerpo a partir de la resina de cHA de Tipo I operada en la combinación de modo de unión / flujo continuo

	Muestra	HMWA %	Rendimiento de monómero %	Proteína A (ppm)
Proceso 1	Carga	27,0	NA	236
	Pico	0,9	75	3,3
Proceso 2	Carga	27,2	NA	---
	Pico	0,7	78	---

35

Ejemplo 11: Análisis sistemático de alto rendimiento de las condiciones de tampón de cHA

Se realizó un análisis sistemático de alto rendimiento para optimizar las condiciones de tampón usadas para purificar una preparación de anticuerpo Myo-029 usando resina de cHA de Tipo I. El análisis sistemático varió los niveles de fosfato sódico, cloruro sódico, arginina y Myo-029 en la resina de cHA de Tipo I y examinó el grado de unión de Myo-029 y los agregados de alto peso molecular (HMWA) en la resina.

40

Se añadió resina de cHA de Tipo I (50 µl) a cada pocillo de una placa de filtro de 96 pocillos. Cada pocillo, marcado como A1, A2...H11, H12 en Tablas 10-12, se equilibró con tampón de equilibrado compuesto por HEPES 20 mM, pH 7,2, y una combinación única de fosfato (Tabla 10), cloruro sódico (Tabla 11), y arginina (Tabla 12).

Tabla 10. Niveles de fosfato en cada pocillo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 mM	1 mM	1 mM	6 mM	5 mM	4 mM	1 mM	1 mM	1 mM	3 mM	2 mM	1 mM
B	1 mM	1 mM	1 mM	6 mM	5 mM	4 mM	1 mM	1 mM	1 mM	3 mM	2 mM	1 mM
C	1 mM	1 mM	1 mM	6 mM	5 mM	4 mM	1 mM	1 mM	1 mM	3 mM	2 mM	1 mM
D	1 mM	1 mM	1 mM	6 mM	5 mM	4 mM	1 mM	1 mM	1 mM	3 mM	2 mM	1 mM
E	2 mM	3 mM	4 mM	8 mM	10 mM	16 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	6 mM	8 mM
F	2 mM	3 mM	4 mM	8 mM	10 mM	16 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	6 mM	8 mM
G	2 mM	3 mM	4 mM	8 mM	10 mM	16 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	6 mM	8 mM
H	2 mM	3 mM	4 mM	8 mM	10 mM	16 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	6 mM	8 mM

Tabla 11. Niveles de NaCl en cada pocillo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	750 mM	625 mM	500 mM	500 mM	400 mM	300m M
B	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	750 mM	625 mM	500 mM	500 mM	400 mM	300m M
C	50 mM	100 mM	200 mM	50 mM	100 mM	1200 mM	1.250 mM	1.750 mM	2.500 mM	600 mM	800 mM	1.000 mM
D	50 mM	100 mM	200 mM	50 mM	100 mM	200 mM	1.250 mM	1.750 mM	2.500 mM	600 mM	800 mM	1.000 mM
E	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	750 mM	625 mM	500 mM	500 mM	400 mM	300m M
F	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	750 mM	625 mM	500 mM	500 mM	400 mM	300m M
G	50 mM	100 mM	200 mM	50 mM	100 mM	200 mM	1.250 mM	1.750 mM	2.500 mM	600 mM	800 mM	1.000 mM
H	50 mM	100 mM	200 mM	50 mM	100 mM	200 mM	1.250 mM	1.750 mM	2.500 mM	600 mM	800 mM	1.000 mM

Tabla 12. Niveles de arginina en cada pocillo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	350 mM	300 mM	200 mM	12 mM	12 mM	12 mM	12 mM	12 mM	12 mM	75 mM	50 mM	25 mM
B	450 mM	500 mM	600 mM	40 mM	120 mM	200 mM	40m M	120 mM	200 mM	125 mM	150 mM	300 mM
C	350 mM	300 mM	200 mM	12 mM	12 mM	12 mM	12 mM	12 mM	12 mM	75 mM	50 mM	25 mM
D	450 mM	500 mM	600 mM	40 mM	120 mM	200 mM	40m M	120 mM	200 mM	125 mM	150 mM	300 mM
E	350 mM	300 mM	200 mM	12 mM	12 mM	12 mM	12 mM	12 mM	12 mM	75 mM	50 mM	25 mM
F	450 mM	500 mM	600 mM	40 mM	120 mM	200 mM	40 mM	120 mM	200 mM	125 mM	150 mM	300 mM
G	350 mM	300 mM	200 mM	12 mM	12 mM	12 mM	12 mM	12 mM	12 mM	75 mM	50 mM	25 mM
H	450 mM	500 mM	600 mM	40 mM	120 mM	200 mM	40m M	120 mM	200 mM	125 mM	150 mM	300 mM

Después de añadir a cada pocillo el tampón de equilibrado único, se añadió a cada pocillo una mezcla de Myo-029 y agregado. El nivel de agregado en la relación de carga fue de un 25 %. Los constituyentes del tampón se mantuvieron al mismo nivel que durante el equilibrado. El material se agitó durante 20 minutos, y se permitió que alcanzara el equilibrio. Se retiró el sobrenadante de cada pocillo de la placa de filtro. Se realizó otra etapa de adición de preparación de anticuerpo, y se agitó la placa, y se retiró el sobrenadante. Se realizaron hasta siete etapas. Se analizó la proteína que no se había unido en cada etapa para determinar la concentración global de proteína (por absorbancia a A280 nm). La cantidad de monómero y de agregado se midió mediante HPLC por exclusión de tamaño. Cualquier disminución en el agregado indicó una condición propicia para la purificación. Las Tablas 13 y 14 muestran el porcentaje de agregado y de monómero, por pocillo, en una mezcla de las primeras cuatro etapas.

Tabla 13. Nivel de agregado (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	8 %	6 %	3 %	4 %	7 %	16 %	3 %	3 %	3 %	5 %	3 %	3 %
B	12 %	15 %	17 %	3 %	3 %	5 %	3 %	4 %	4 %	6 %	5 %	5 %
C	7 %	6 %	3 %	4 %	4 %	3 %	5 %	4 %	4 %	6 %	6 %	4 %
D	13 %	14 %	14 %	6 %	4 %	7 %	5 %	6 %	4 %	8 %	8 %	7 %
E	11 %	10 %	6 %	4 %	19 %	11 %	5 %	6 %	7 %	9 %	8 %	6 %
F	15 %	19 %	20 %	4 %	3 %	10 %	6 %	8 %	10 %	10 %	10 %	17 %
G	10 %	9 %	6 %	6 %	3 %	7 %	8 %	14 %	17 %	10 %	16 %	22 %
H	16 %	18 %	20 %	4 %	5 %	17 %	9 %	15 %	17 %	12 %	17 %	18 %

Tabla 14. Recuperación de monómero (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	51 %	44 %	24 %	3 %	3 %	2 %	43 %	34 %	25 %	53 %	32 %	11 %
B	64 %	70 %	78 %	4 %	24 %	43 %	42 %	40 %	38 %	57 %	42 %	44 %
C	49 %	43 %	27 %	4 %	6 %	23 %	60 %	62 %	62 %	58 %	60 %	48 %
D	65 %	68 %	75 %	5 %	35 %	54 %	61 %	64 %	64 %	63 %	63 %	62 %
E	61 %	58 %	44 %	3 %	3 %	5 %	58 %	62 %	64 %	66 %	65 %	63 %
F	70 %	76 %	88 %	5 %	33 %	63 %	59 %	63 %	68 %	67 %	68 %	74 %
G	57 %	57 %	50 %	4 %	7 %	65 %	72 %	82 %	85 %	70 %	80 %	83 %
H	71 %	75 %	85 %	5 %	48 %	75 %	69 %	82 %	88 %	71 %	80 %	87 %

El análisis sistemático de alto rendimiento fue capaz de predecir cualitativamente la recuperación de monómero y la retirada de HMWA en un esquema de purificación de columna. Por ejemplo, las condiciones del pocillo C8 (HEPES 20 mM, Fosfato 1 mM, NaCl 1750 mM, y arginina 12 mM, pH 7,2) se ensayaron en una columna empaquetada con resina de cHA de Tipo I. Los niveles de agregado se redujeron a un 2,5 % y el rendimiento de monómero fue de un 72 %, después de la purificación en columna. Las condiciones del pocillo D5 (HEPES 20 mM, Fosfato 5 mM, NaCl 100 mM, y arginina 120 mM, pH 7,2) también se ensayaron en una columna empaquetada con resina de cHA-1. Los niveles de agregado se redujeron a un 0,7 % y el rendimiento de monómero fue de un 73 %, después de la purificación en columna. Finalmente, las condiciones equivalentes al pocillo C3 (HEPES 100 mM, Fosfato 1 mM, NaCl 120 mM, y arginina 200 mM, pH 7,2, en las que el alto nivel de HEPES contribuye a la fuerza iónica de forma similar al NaCl) se ensayaron en una columna empaquetada con resina de cHA-1. Los niveles de agregado se redujeron a un 4 %, con una recuperación de monómero de un 69 %, después de la purificación en columna. Estos resultados demuestran que el análisis sistemático de alto rendimiento subestima el rendimiento de la columna que se mide tanto para la recuperación de monómero como para la retirada de HMWA. Sin embargo, el análisis sistemático de alto rendimiento es capaz de predecir cualitativamente tanto el rendimiento como la pureza.

Todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, y demás usados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones se entiende que están modificados en todos los ejemplos por el término "aproximadamente". Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener por la presente invención. Cuando menos, y no

como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico se debería interpretar a la luz del número de cifras significativas y las aproximaciones ordinarias de redondeo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación de al menos un monómero de anticuerpo de una preparación de anticuerpo que contiene agregados de alto peso molecular que comprende someter la preparación de anticuerpo a cromatografía de hidroxapatita, en el que la cromatografía de hidroxapatita comprende:
 - 5 - poner en contacto una resina de hidroxapatita en una columna con la preparación de anticuerpo, en el que la columna es equilibrada con un tampón de equilibrado que tiene un pH de 6,4 a 7,4 y que comprende fosfato sódico de 1 a 20 mM y NaCl de 0 a 200 mM, y,
 - opcionalmente lavar la columna con un tampón de lavado que tiene un pH de 6,4 a 7,4 y que comprende fosfato sódico de 1 a 20 mM y NaCl de 0 a 200 mM, y,
 - 10 - eluir el anticuerpo purificado de la resina con al menos un tampón de elución que tiene un pH de 6,4 a 7,6 y que comprende fosfato sódico de 1 a 20 mM y NaCl de 0,2 a 2,5 M.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además someter la preparación de anticuerpo a (a) cromatografía de afinidad de Proteína A, y (b) cromatografía de intercambio iónico.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la cromatografía de afinidad de Proteína A es realizada en primer lugar y la cromatografía de hidroxapatita es realizada en último lugar.
- 15 4. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que la cromatografía de hidroxapatita comprende:
 - poner en contacto una resina de hidroxapatita en una columna con la preparación de anticuerpo, en el que la columna es equilibrada en una primera etapa con un tampón de equilibrado que tiene un pH de 6,4 a 7,4 y que comprende fosfato sódico de 10 a 500 mM y NaCl 1 M, y, en una segunda etapa con un tampón de equilibrado que tiene un pH de 6,4 a 7,4 y que comprende fosfato sódico de 1 a 20 mM y NaCl de 0 a 200 mM, y,
 - 20 - opcionalmente lavar la columna con un tampón de lavado que tiene un pH de 6,4 a 7,4 y que comprende fosfato sódico de 1 a 20 mM y NaCl de 0 a 200 mM, y,
 - eluir el anticuerpo purificado de la resina con al menos un tampón de elución que tiene un pH de 6,4 a 7,6 que comprende fosfato sódico de 1 a 20 mM y NaCl de 0,2 a 2,5 M.
5. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que la cromatografía de hidroxapatita comprende la etapa de lavar la columna con un tampón de lavado que tiene un pH de 6,4 a 7,4 y que comprende fosfato sódico de 1 a 20mM y NaCl de 0 a 200 mM.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo purificado contiene menos de un 5 % de agregados de alto peso molecular.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tampón de elución contiene fosfato sódico 3 mM o 5 mM.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tampón de elución contiene NaCl de 0,3 M a 2,5 M.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tampón de elución contiene NaCl de 0,3 M a 1,1 M.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tampón de elución contiene NaCl de 0,35 M a 1 M.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado, o un fragmento de los mismos.
13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es un anticuerpo receptor anti-IL-21, anti-GDF-8, anti-Abeta, anti-CD22, anti-Lewis Y, anti-IL-13, o anti-IL-22.
14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo tiene un pI básico.
15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la resina es hidroxapatita cerámica de tipo I o de tipo II.
16. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la cromatografía de intercambio iónico es cromatografía de intercambio aniónico.

17. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo purificado contiene menos de 300 ppm de Proteína A.

Figura 1

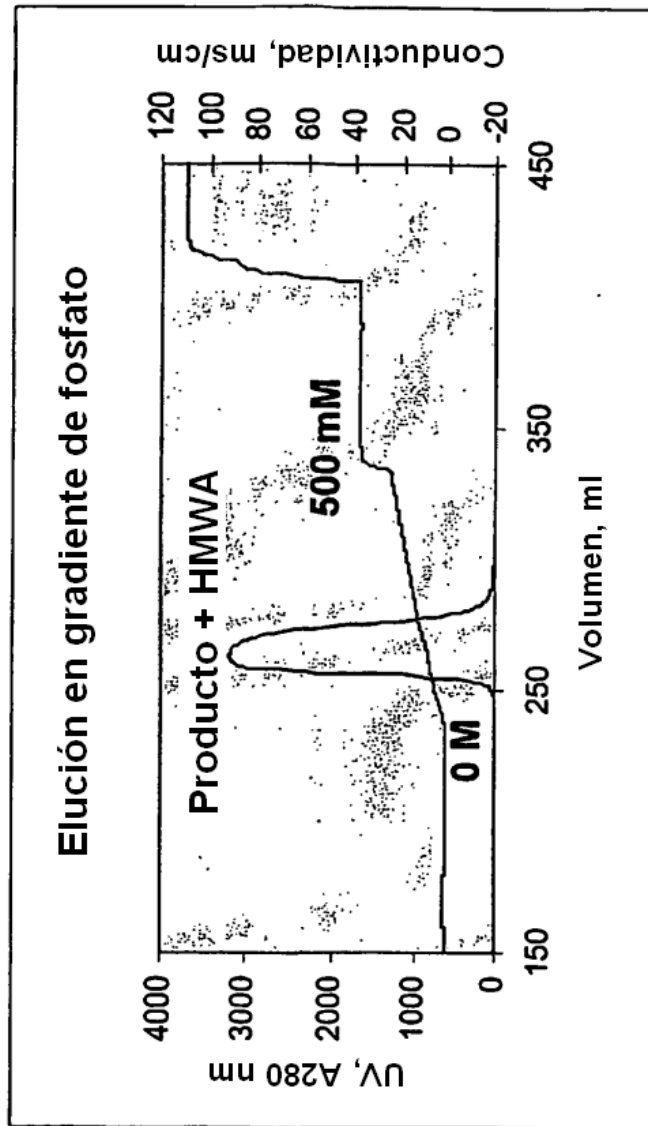


Figura 2

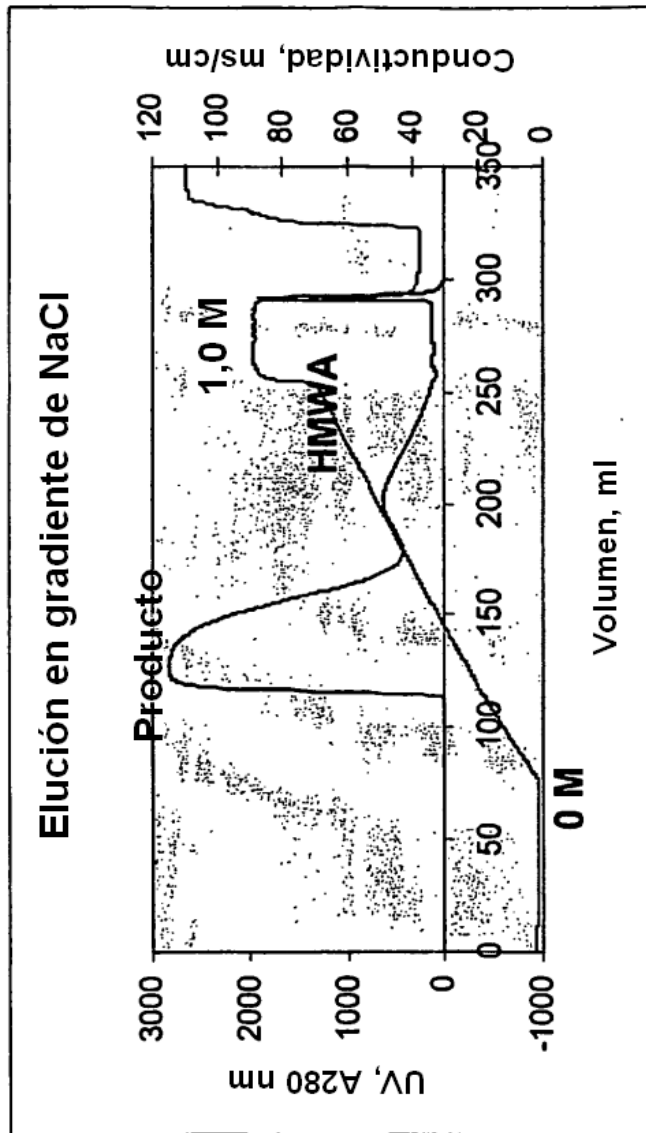


Figura 3

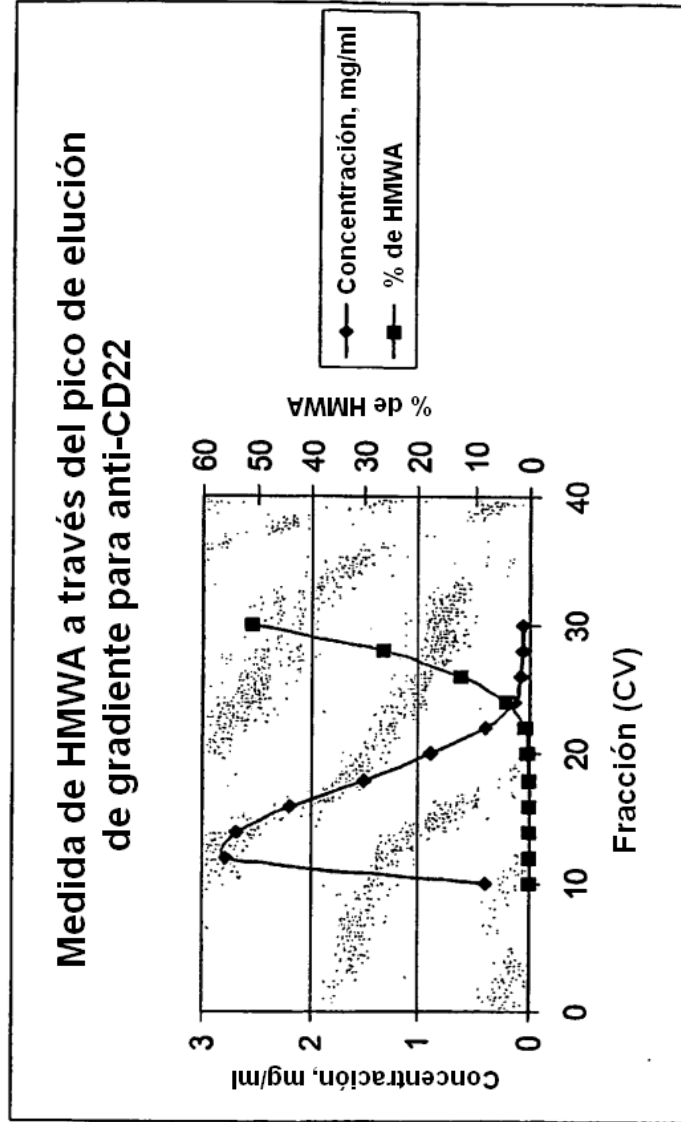


Figura 4

