

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 396**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2011 PCT/IB2011/053392**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012 WO12014183**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2011 E 11752642 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2598515**

54 Título: **Purificación en tándem de proteínas**

30 Prioridad:

30.07.2010 US 369557 P

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

27.02.2017

73 Titular/es:

**PFIZER INC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**COFFMAN, JONATHAN, LEE;
GODAVARTI, RANGANATHAN y
SHAMASHKIN, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 603 396 T3

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

DESCRIPCIÓN

Purificación en tándem de proteínas

Antecedentes

5 Las proteínas deben tener un cierto grado de pureza para aplicaciones comerciales tales como usos terapéuticos y de diagnóstico. Las proteínas recombinantes se producen típicamente en células eucariotas o procariotas cultivadas manipuladas mediante ingeniería genética para expresar un gen que codifica la proteína. Las proteínas expresadas se separan de las impurezas tales como proteínas de la célula huésped no relacionadas, otros componentes de la célula huésped (por ejemplo, ADN, membranas celulares, etc.) y componentes de medios. Las técnicas de purificación tales como cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad por metales inmovilizados y cromatografía de hidroxapatita, separan las impurezas en base a diferencias en el tamaño, carga, solubilidad, hidrofobicidad, y/o afinidad por un ligando. Es una prueba para las empresas en el campo de los productos farmacéuticos desarrollar procedimientos de purificación que cumplen con las exigentes normas reguladoras de una manera rentable.

Sumario

15 Con el fin de alcanzar el grado apropiado de pureza para el uso comercial de proteínas terapéuticas y de diagnóstico, los protocolos de purificación a menudo requieren el uso de dos o más etapas de purificación. Los retos se presentan por los esquemas de purificación más complejos. Por ejemplo, grupos de productos procesados por un modo de purificación deben ser compatibles para su procesamiento en un segundo modo de purificación. Además, grupos de productos parcialmente procesados deben ser almacenados correctamente cuando los sistemas de purificación aguas abajo no están inmediatamente disponibles para su uso. Múltiples sistemas requieren múltiples etapas de muestreo y validación para garantizar un funcionamiento coherente y correcto. Los sistemas que integran múltiples modos de purificación reducirían potencialmente la complejidad de los esquemas de purificación actuales, mejorando así la eficiencia y reduciendo el coste de la manipulación de proteínas manufacturadas.

25 La presente divulgación proporciona, *entre otras cosas*, procedimientos de purificación de proteínas utilizando sistemas en los que las unidades de purificación están unidas en tándem y que permiten el funcionamiento robusto de unidades de purificación. Los procedimientos que mantienen la robustez sobre las variaciones en los parámetros de funcionamiento (por ejemplo, velocidad de la bomba, adición volumétrica de reactivos de valoración, etc.) requieren menos control de realimentación y son más rentables, de ese modo, en la práctica, lo que reduce el coste de producción de las proteínas purificadas. La integración de unidades de purificación elimina la necesidad de almacenar reservas de productos parcialmente procesados entre ejecuciones. El producto puede procesarse en un solo turno, reduciendo el tiempo de purificación. La integración también reduce los requisitos de muestreo, validación y documentación (por ejemplo, el muestreo de la carga biológica, documentación registro de lotes, etc.). Las variaciones en parámetros tales como caudales, presión de retorno y mezcla del reactivo de valoración y el eluato entre columnas pueden alterar la unión del producto y comprometer la recuperación y la calidad del producto. Las características de los presentes procedimientos proporcionan una alta tolerancia a tales variaciones.

40 De acuerdo con ello, en un aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos de recuperación de un producto purificado (por ejemplo, un producto de proteína, por ejemplo, un anticuerpo) de un fluido. En algunas formas de realización, un procedimiento incluye: a) exponer un fluido de carga que comprende un producto de proteína a una columna que comprende una primera resina en condiciones en las que el producto se une a la resina; b) recuperar fluido que comprende el producto de la primera resina para producir un primer eluato; c) valorar el primer eluato con un reactivo de valoración a medida que pasa a la segunda resina, d) exponer el eluato valorado a una columna que comprende la segunda resina en condiciones en las que el producto se une a la segunda resina, en el que la columna que comprende la primera resina está dispuesta en tándem con la columna que comprende la segunda resina; y e) recuperar fluido que comprende el producto de la segunda resina para producir un segundo eluato, recuperando de esta manera un producto de proteína purificada a partir de un fluido de carga.

45 En algunas realizaciones, un reactivo de valoración altera una o más condiciones del primer eluato tal, cuando la relación volumétrica del eluato frente al reactivo de valoración varía hasta el 40 %, el cambio en el coeficiente de reparto (Kp) del producto para la segunda resina es menos del 10 %.

50 Un primer eluato se puede valorar con un reactivo de valoración en una diversidad de proporciones volumétricas. En algunas realizaciones, un primer eluato se valora con el reactivo de valoración en una proporción volumétrica de entre aproximadamente 95:5 a 80:20. En algunas realizaciones, un eluato se valora con una proporción volumétrica fija del reactivo de valoración.

55 En algunas realizaciones, el flujo de fluidos a través de un sistema en tándem de unidades de purificación se facilita por una o más bombas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una primera bomba suministra un fluido de carga a una primera resina, una segunda bomba suministra un reactivo de valoración para el primer eluato. Las bombas pueden hacerse funcionar en una proporción de caudales que varía en menos del 30 %, 20 %, o 10 %. En algunas realizaciones, un eluato y reactivo de valoración se hacen pasar a través de un mezclador antes de la exposición a una unidad de purificación posterior. Un funcionamiento en tándem puede incluir opcionalmente un monitor de pH para la

detección de pH en una fase dada de la purificación (por ejemplo, antes de una unidad de purificación, la operación de la cual se ve afectada por el pH).

5 En algunas realizaciones, los procedimientos de purificación incluyen hacer pasar un fluido a través de uno o más filtros (por ejemplo, un filtro de 0,2 μm). En algunas realizaciones de un procedimiento de purificación en tándem, se coloca un filtro entre dos columnas.

10 Además de, o como alternativa a los filtros, los sólidos se pueden eliminar de los fluidos por precipitación. En algunas realizaciones, los sólidos se precipitan a partir de un fluido usando un floculante polimérico. En algunas realizaciones, los sólidos se precipitan a partir de un fluido usando un catión y anión que forman una sal que tiene solubilidad baja (por ejemplo, en el que la constante de producto de solubilidad de una sal que tiene el catión y el anión es menos de aproximadamente 10^{-4} M^2 ; por ejemplo, usando calcio y fosfato).

15 En algunas formas de realización, un fluido de carga expuesto a una serie de unidades de purificación incluye un medio de cultivo celular. Un medio de cultivo celular puede ser uno en el que se han eliminado las células (por ejemplo, por centrifugación). En algunas formas de realización, un medio de cultivo celular puede estar libre de suero (por ejemplo, carente de proteínas añadidas y/o de productos animales añadidos).

20 Los procedimientos proporcionados en este documento pueden utilizarse para recuperar los diversos tipos de productos de interés. En muchas realizaciones, un producto es una proteína tal como un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo de cadena única, etc.), la proteína de fusión Fc, o un producto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP™). La purificación de los anticuerpos, proteínas de fusión Fc y/o productos inmunofarmacéuticos modulares puede incluir el uso de una resina que se une selectivamente a las inmunoglobulinas, tales como la proteína A (proA).

25 En diversas realizaciones de los procedimientos proporcionados en este documento, un reactivo de valoración altera una o más condiciones del primer eluato de tal manera que el producto en el eluato valorado se une a la segunda resina en un modo de partición débil. Por ejemplo, las condiciones de un eluato valorado y una resina puede ser tales que el coeficiente de reparto (Kp) del producto para la resina es 0,1 a 20 (por ejemplo, 0,2 a 10, o 0,5 a 5). En algunas realizaciones, un reactivo de valoración altera una o más condiciones del primer eluato de tal manera que la segunda resina se une a al menos 1 mg de producto por ml de la resina (por ejemplo, al menos 5 mg, 10 mg, 20 mg, 40 mg, 50 mg, o 60 mg de producto por ml).

En los procedimientos proporcionados en el presente documento, el pH de un eluato valorado expuesto a una segunda resina puede ser variable.

30 Los procedimientos establecidos en el presente documento pueden incluir el uso de una resina de intercambio iónico. En algunas realizaciones, la resina de intercambio iónico es una resina de intercambio aniónico. En algunas realizaciones, el reactivo de valoración tiene un pH que está 0,5 unidades por encima de un pH en el que la resina de intercambio aniónico se une al producto en el eluato valorado en un modo de partición débil.

35 En algunas realizaciones, un reactivo de valoración comprende una sal. Se puede utilizar un reactivo de valoración que aumenta la fuerza iónica de un eluato de una primera resina de manera que un producto tal mantiene la unión a una segunda resina (por ejemplo, una resina de intercambio iónico) en un intervalo de adiciones de volumen de reactivo de valoración. En algunas realizaciones, un reactivo de valoración tiene una concentración de sal de al menos 50 mM (por ejemplo, al menos 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 500 mM, 750 mM, 1 M, o más).

40 En algunas realizaciones, una resina de intercambio iónico utilizada en un procedimiento proporcionado en el presente documento es una resina de intercambio catiónico.

45 Los fluidos procesados por procedimientos proporcionados pueden ser tratados con uno o más tratamientos de reducción de virus, tales como la inactivación por ácido, la inactivación por detergente, el paso a través de un filtro de reducción de virus, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, un tratamiento de inactivación de virus usado en un procedimiento no incluye la inactivación por ácido. En algunas formas de realización, un procedimiento incluye el tratamiento de un fluido de carga con un detergente antes de exponer el fluido de carga a una primera resina en un sistema en tándem. En algunas realizaciones en las que se usa un filtro de reducción de virus, una bomba suministra fluido al filtro.

Los procedimientos que pueden incluir los tratamientos de reducción de viscosidad se pueden incluir, por ejemplo, el calor, la adición de sal, la alteración del pH, o una combinación de los mismos.

50 En ciertas realizaciones, una primera resina es una resina de proteína A, una segunda resina es una resina de intercambio iónico y un producto se recupera de la primera resina en un fluido que comprende un tampón que tiene una pKa que está cerca de las condiciones en las que el producto eluye a partir de la primera resina y un tampón que tiene una pKa cerca de condiciones en las que el producto se une a la segunda resina en un modo de partición débil. En algunas realizaciones, un producto se recupera a partir de una primera resina en un fluido que comprende un tampón que tiene una pKa mayor que 5,5 (por ejemplo, Tris).

- 5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos de preparación de un fluido de carga para la exposición a una resina de intercambio iónico. Un procedimiento incluye, por ejemplo: a) proporcionar un fluido de carga que comprende un producto de proteína que se une a la resina de intercambio iónico y b) añadir un reactivo de valoración para el fluido de carga, en el que el reactivo de valoración aumenta la fuerza iónica del fluido de carga de tal manera que el producto mantiene la unión a la resina de intercambio iónico en un intervalo de adiciones de volumen de reactivo de valoración.
- En algunas realizaciones, el fluido de carga es un eluato de una resina de proteína A.
- En algunas realizaciones, un procedimiento incluye exponer el eluato valorado a la resina de intercambio iónico en condiciones en las que el producto se une a la resina.
- 10 En algunas realizaciones, la resina de intercambio iónico es una resina de intercambio aniónico.
- Los procedimientos pueden incluir exponer un fluido de carga (por ejemplo, un segundo eluato) a una o más resinas adicionales y recuperar fluido que comprende el producto a partir de la(s) resina(s). En algunas formas de realización, un fluido de carga se expone a una resina de hidroxiapatita (por ejemplo, una resina de cerámica de hidroxiapatita), una resina de interacción hidrófoba, una resina de afinidad de metal, una resina de intercambio iónico, o a una combinación de las mismas.
- 15 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos de preparación de un fluido de carga para la exposición a una resina de intercambio iónico. Un procedimiento incluye, por ejemplo: a) proporcionar un fluido de carga que comprende un producto proteico que se une a la resina de intercambio iónico; y b) añadir un reactivo de valoración para el fluido de carga, en el que el reactivo de valoración tiene una concentración de sal de al menos 50 mM (por ejemplo, al menos 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 500 mM, 750 mM, 1 M, o más).
- 20 En algunas realizaciones, el fluido de carga es un eluato de una resina de proteína A.
- En algunas realizaciones, un procedimiento incluye exponer el eluato valorado a la resina de intercambio iónico en condiciones en las que el producto se une a la resina.
- En algunas realizaciones, la resina de intercambio iónico es una resina de intercambio aniónico.
- 25 Los procedimientos pueden incluir además la exposición de un fluido de carga (por ejemplo, eluato de una resina de intercambio aniónico) a una o más resinas adicionales y la recuperación de fluido que comprende el producto de la(s) resina(s). En algunas formas de realización, un fluido de carga se expone a una resina de hidroxiapatita (por ejemplo, una resina de cerámica de hidroxiapatita), una resina de interacción hidrófoba, una resina de afinidad de metal, una resina de intercambio iónico, o a una combinación de las mismas.
- 30 En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona procedimientos para la recuperación de un producto de proteico purificado a partir de un fluido de carga. Un procedimiento incluye, por ejemplo: a) exponer un fluido de carga que comprende un producto de proteína a una columna que comprende una primera resina en condiciones en las que el producto se une a la resina, en el que la primera resina es una resina de Proteína A; b) eluir fluido que comprende el producto de la primera resina para producir un primer eluato, en el que el producto se eluye a partir de la primera resina en un fluido de elución que comprende un tampón que tiene una pKa que está cerca de condiciones en las que el producto se eluye de la resina y un tampón que tiene una pKa cerca de condiciones en las que el producto se une a la segunda resina en un modo de partición débil; c) exponer el eluato valorado con un reactivo de valoración a medida que pasa a la segunda resina; d) exponer el eluato valorado a una columna que comprende la segunda resina en condiciones en las que el producto se une a la segunda resina; y e) recuperar fluido que comprende el producto de la
- 35 segunda resina para producir un segundo eluato, recuperando de esta manera un producto de proteína purificada a partir de un fluido de carga.
- 40 En algunas realizaciones, la columna que comprende la primera resina está dispuesta en paralelo con la columna que comprende la segunda resina. En algunas realizaciones, la segunda resina es una resina de intercambio iónico (por ejemplo, una resina de intercambio aniónico, o una resina de intercambio catiónico).
- 45 Los procedimientos pueden incluir exponer un fluido de carga (por ejemplo, un segundo eluato) a una o más resinas adicionales y recuperar fluido que comprende el producto a partir de la(s) resina(s). En algunas formas de realización, un fluido de carga se expone a una resina de hidroxiapatita (por ejemplo, una resina de cerámica de hidroxiapatita), una resina de interacción hidrófoba, una resina de afinidad de metal, una resina de intercambio iónico, o a una combinación de las mismas.
- 50 En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos de recuperación de un producto proteico purificado a partir de un fluido de carga. Un procedimiento incluye, por ejemplo: a) exponer un fluido de carga que comprende un producto de proteína a una columna que comprende una primera resina en condiciones en las que el producto se une a la resina, en el que la primera resina es una resina de proteína A; b) eluir fluido que comprende el producto de la primera resina para producir un primer eluato, en el que el producto se eluye de la primera resina en un fluido de elución que comprende un tampón que tiene una pKa mayor que 5,5; c) valorar el primer eluato con un reactivo de
- 55

valoración a medida que pasa a la segunda resina; d) exponer el eluato valorado a una columna que comprende la segunda resina en condiciones en las que el producto se une a la segunda resina; y e) recuperar fluido que comprende el producto de la segunda resina para producir un segundo eluato, recuperando de esta manera un producto de proteína purificada a partir de un fluido de carga.

- 5 En algunas realizaciones, la columna que comprende la primera resina está dispuesta en paralelo con la columna que comprende la segunda resina. En algunas realizaciones, la segunda resina es una resina de intercambio iónico (por ejemplo, una resina de intercambio aniónico, o una resina de intercambio catiónico).

Los procedimientos pueden incluir exponer un fluido de carga (por ejemplo, un segundo eluato) a una o más resinas adicionales y recuperar fluido que comprende el producto a partir de la(s) resina(s). En algunas formas de realización, un fluido de carga se expone a una resina de hidroxiapatita (por ejemplo, una resina de cerámica de hidroxiapatita), una resina de interacción hidrófoba, una resina de afinidad de metal, una resina de intercambio iónico, o a una combinación de las mismas.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona procedimientos para la recuperación de un producto proteico purificado a partir de un fluido de carga. Un procedimiento incluye, por ejemplo: a) exponer un fluido de carga que comprende un producto proteico a una columna de proteína A que comprende condiciones en las que el producto se une a la proteína A; b) eluir fluido que comprende el producto de la columna de proteína A para producir un primer eluato, en el que el producto se eluye de la primera resina en un fluido de elución que comprende un tampón que tiene una pKa que está cerca de condiciones en las que el producto se eluye de la resina y un tampón que tiene una pKa cerca de condiciones en las que el producto se une a la segunda resina en un modo de partición débil; y c) valorar el primer eluato con un reactivo de valoración a medida que eluye de la columna de proteína A, en el que el reactivo de valoración altera una o más condiciones del primer eluato de tal manera que el producto en el eluato valorado se une a una resina de intercambio aniónico en un modo de partición débil, en el que el reactivo de valoración altera una o más condiciones del primer eluato de tal forma que cuando la proporción volumétrica del eluato al reactivo de valoración varía hasta el 40 %, el cambio en el coeficiente de reparto del producto para la segunda resina es menos del 10 % y en el que el reactivo de valoración aumenta la fuerza iónica del eluato de la primera resina de manera que el producto mantiene la unión a la segunda resina en un intervalo de adiciones de volumen de reactivo de valoración; d) exponer el material eluido a una columna que comprende la resina de intercambio aniónico en condiciones en las que el producto se une a la resina de intercambio aniónico, en el que la columna de proteína A está dispuesta en tándem con la columna que comprende la resina de intercambio aniónico; y e) la recuperación de fluido que comprende el producto de la resina de intercambio aniónico para producir un segundo eluato, recuperando de esta manera un producto proteico purificado a partir de un fluido de carga.

En algunas realizaciones, un primer eluato se valora con el reactivo de valoración en una proporción volumétrica de entre aproximadamente 95:5 a 80:20.

En algunas realizaciones, el flujo de fluidos a través de un sistema en tándem de unidades de purificación se facilita por una o más bombas. Las bombas pueden hacerse funcionar en una proporción de caudales que varía en menos del 30 %, 20 %, o 10 %.

En algunas formas de realización, un fluido de carga expuesto incluye un medio de cultivo celular, por ejemplo, un medio de cultivo celular del que se han eliminado las células (por ejemplo, mediante centrifugación).

En algunas formas de realización, un producto es una proteína tal como un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo de cadena única, etc.), una proteína de fusión Fc, o un producto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP™).

En algunas formas de realización, las condiciones de un eluato valorado y de una resina pueden ser tales que el coeficiente de reparto (Kp) del producto de la resina es 0,1 a 20 (por ejemplo, 0,2 a 10, o 0,5 a 5). En algunas realizaciones, un reactivo de valoración altera una o más condiciones del primer eluato de tal manera que la segunda resina se une a al menos 1 mg de producto por ml de la resina (por ejemplo, al menos 5 mg, 10 mg, 20 mg, 40 mg, 50 mg, o 60 mg de producto por ml).

En algunas realizaciones, el reactivo de valoración tiene un pH que está 0,5 unidades por encima de un pH en el que la resina de intercambio aniónico se une al producto en el eluato valorado en un modo de partición débil.

En algunas realizaciones, un reactivo de valoración comprende una sal. En algunas realizaciones, un reactivo de valoración tiene una concentración salina de al menos 50 mM (por ejemplo, al menos 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 500 mM, 750 mM, 1 M, o más). Los procedimientos pueden incluir, además, la exposición de un fluido de carga (por ejemplo, un segundo eluato) a una o más resinas adicionales y a fluido recuperación adicional que comprende el producto de la(s) resina(s). En algunas formas de realización, un fluido de carga se expone a una resina de hidroxiapatita (por ejemplo, una resina de cerámica de hidroxiapatita), una resina de interacción hidrófoba, una resina de afinidad de metal, una resina de intercambio iónico, o a una combinación de las mismas.

También se proporcionan sistemas para llevar a la práctica los procedimientos proporcionados.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 es una representación esquemática de un funcionamiento en tándem ejemplar de una columna de proteína A (ProA), una columna de intercambio aniónico (AEX) y un filtro de reducción de virus (VRF).

5 La FIG. 2 muestra una parte de un cromatograma proA-AEX-VRF en tándem en proceso obtenido en un sistema AKTA FPLC, que muestra el pico de elución y la región de cinta de AEX. Se muestran señal de UV a 280 nm (mAU); presión total del sistema (Pa (psi)); pH del efluente proA neutralizado; y conductividad de efluente de AEX. Las lecturas de pH y presión en cada fase del procedimiento se obtuvieron con sensores en línea y pueden no ser exactas.

10 La FIG. La figura 3 muestra un cromatograma proA-AEX-VRF en tándem obtenido a partir de un análisis fuera de línea de las fracciones pico (volumen de cada fracción = 1/2 de AEX CV). Cuadrados-concentración proteica. Círculos-presión a través del dispositivo de VRF.

Las FIG. 4A y 4B son gráficos que muestran la turbidez en las fracciones pico proA (-0,2 CV) antes y después de la neutralización. La FIG. 4A. Carga floculada y filtrada en lecho corto. La FIG. 4B. Carga filtrada en lecho corto, sin floculación. Fracción A5 corresponde a un ápice del pico, con la concentración de proteína de 55 mg/ml.

15 La FIG. 5 es un gráfico que muestra el análisis fuera de línea de la concentración de proteína y el pH de un pico proA fraccionado neutralizado en línea con un volumen constante de reactivo de valoración al 12 %.

Las FIG. 6A y 6B son gráficos que muestran ejemplos de pH, $[Cl^-]$ y K_p como funciones de la relación de neutralización (v). La FIG. 6A. En un modo control (estado actual de la técnica) de neutralización en tándem, donde no se añade sal alguna al tampón de neutralización. La FIG. 6B. En un modo robusto (de la invención) de neutralización en tándem, donde se añade la sal al tampón de neutralización.

20 Las FIG. 7A y 7B son gráficos que muestran bocetos de funcionales de iso- K_p y $pH = f([Cl^-])$. La FIG. 7A. Modo Control (estado actual de la técnica). La FIG. 7B. Un modo Robusto (la invención), que muestra la región de solapamiento.

La FIG. 8 es un gráfico que muestra $K_p = f(v)$ simulado para los modos de purificación de proA-trimetilaminoetilato (TMAE) en tándem Control (cuadrados) y Robusto (cruces) de un MAb de control terapéutico. El gráfico muestra tres condiciones ensayadas experimentalmente.

25 La FIG. 9 es un gráfico que muestra la función de cambio relativa de K_p , k , para los modos de funcionamiento en tándem Control (cruces) y Robusto (cuadrados). El área resaltada muestra la ventana de funcionamiento robusto.

La FIG. 10 es un gráfico que muestra las trazas UV superpuestas obtenidas a diferentes proporciones de neutralización, v , en los modos de neutralización Control y Robusto.

30 Las FIG. 11A-11F son gráficos que muestran el análisis fuera de línea de producto en tándem proA-TMAE recogido en fracciones de 1 TMAE CV. Los gráficos están dispuestos de la siguiente manera: lado izquierdo (fig. 11A, 11C, 11E)-modo Control; lado derecho (FIG.11B, 11D, 11F)-modo Robusto; panel superior (Fig. 11A, 11B)-situación sub-valorada ($v = 6,5\%$); Panel medio (fig. 11C, 11D)-centro punto ($v = 11,5\%$); panel inferior (fig. 11E, 11F)-situación sobre-valorada ($v = 16,5\%$);

35 Las FIG. 12A y 12B son bocetos de cromatogramas proA-AEX en tándem que muestran concentraciones de componentes de tampón básicos (pK_a alta) y ácidos (pK_a baja) suministrados por las bombas A y B tras la neutralización: La FIG. 12A. Estado actual de la técnica: pH se somete a una fase de expansión debido a la sobre-valoración. FIG. 12B. Condiciones de la invención: El tampón tampón básico está presente en el tampón de elución en un estado completamente protonado, que proporciona resistencia contra el cambio de pH en la neutralización. Las FIG. 13A y 13B son gráficos que muestran ejemplos de pH, $[Cl^-]$ y K_p como funciones de v para la neutralización por lotes. La FIG. 13A. En un modo Control (estado actual de la técnica), donde no se añade sal alguna al tampón de neutralización. La FIG. 13B. En un modo Robusto (proporcionado en el presente documento), donde se añade la sal al tampón de neutralización.

45 Las FIG. 14A y 14B son gráficos que muestran ejemplos de los modos Control y Robusto de neutralización por lotes. La FIG. 14A. $K_p = f(v)$ gráfico que muestra tres situaciones de valoración; FIG. 14B. Función de cambio de K_p relativa, k . El área resaltada muestra la ventana de funcionamiento robusto.

50 Las FIG. 15A, 15B y 15C son gráficos que muestran procedimientos de comparación de purificación de productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños. La FIG. 15A muestra los resultados de una purificación AEX control (por lotes). Las FIG. 15B y 15C muestran los resultados de la cromatografía proA-AEX en tándem a $K_p = 1,5$ sin Tris en el tampón de elución de proteína A (FIG. 15B) y con Tris en el tampón de elución (FIG. 15C). Medidas fuera de línea de pH (diamantes), concentración proteica (cuadrados) y especies de peso molecular alto (triángulos, círculos) se representan gráficamente.

Las FIG. 16A, 16B y 16C son gráficos que muestran una comparación de los procedimientos para la purificación de productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños. La FIG. 16A muestra los resultados de una purificación AEX control (por lotes). Las FIG. 16B y 16C muestran los resultados de la cromatografía proA-AEX en tándem a $K_p = 3,0$ sin

Tris en el tampón de elución de la proteína A (FIG. 16B) y con Tris en el tampón de elución (FIG. 16C). Medidas fuera de línea de pH (diamantes), concentración proteica (cuadrados) y especies de peso molecular alto (HMW) (triángulos, círculos) se representan gráficamente.

Definiciones

- 5 El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier inmunoglobulina o fragmento de la misma y abarca cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión al antígeno. El término incluye, pero no se limita a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, no específicos, humanizados, humanos, de cadena sencilla, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, injertados y en generados in vitro. El término «anticuerpo» también incluye fragmentos de anticuerpos tales como Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb, nanocuerpos, receptores de antígenos nuevos de inmunoglobulinas (IgNARS), maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y otras moléculas que conservan la función de unión al antígeno. Típicamente, tales fragmentos comprenderían un dominio de unión a antígeno.

- 15 En ciertas realizaciones, un anticuerpo es uno que comprende una región C_{H2}/C_{H3} y por lo tanto es susceptible de purificación por cromatografía de proteína A. El término "región C_{H2}/C_{H3}" se refiere a aquellos residuos aminoacídicos en la región Fc de una molécula de inmunoglobulina que interaccionan con la proteína A. En algunas formas de realización, una región C_{H2}/C_{H3} comprende una región C_{H2} intacta seguida de una región C_{H3} intacta y en otras formas de realización, comprende una región Fc de una inmunoglobulina. Los ejemplos de proteínas que contienen región C_{H2}/C_{H3} incluyen anticuerpos, proteínas de inmunoadhesión y proteínas de fusión que comprenden una proteína de interés fusionada a, o conjugada con, una región C_{H2}/C_{H3}.

- 20 Un "producto unido" (O), como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de producto que se une a una resina cuando está en equilibrio con una corriente de alimentación.

- Un "eluato", como se usa en el presente documento, se refiere a un fluido que ha sido expuesto a una resina. Un eluato puede ser un fluido que incluye un fluido de carga que ha sido expuesto a una resina (por ejemplo, fluido "de circulación"); un fluido de lavado (por ejemplo, un tampón de lavado) que se ha expuesto a una resina; un fluido de lavado isocrático que ha sido expuesto a una resina; un fluido de elución que ha sido expuesto a una resina; y combinaciones de los mismos. "Eluatos" incluyen fluidos recuperados a partir de resinas que funcionan en circulación, en partición débil y en modos cromatográficos de elución de unión.

- 30 Una "impureza", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula que no sea una proteína de interés purificándose que también está presente en una muestra de la proteína de interés purificándose. Las impurezas incluyen macromoléculas biológicas tales como un ADN, un ARN, proteínas, variantes de proteínas, tales como proteínas agregadas, especies de alto peso molecular, especies de bajo peso molecular y fragmentos y especies desamidadas; otras proteínas de células huésped que secretan la proteína que se purifica (proteínas de células huésped); moléculas que son parte de un absorbente utilizado para la cromatografía que pueden filtrarse en una muestra durante las etapas de purificación anteriores, tales como la proteína A; endotoxinas; restos celulares; y virus.

"Cromatografía isocrática", como se usa en el presente documento, se refiere a la operación de una columna cromatográfica con un disolvente que no cambia la fuerza durante el período de interés.

Un "lavado esencialmente isocrático", como se usa en el presente documento, se refiere a una solución que varía solo ligeramente a partir de un fluido de carga en la composición y/o el pH.

- 40 Una "carga", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier material que contiene un producto de interés. Un "fluido de carga" se refiere a cualquier líquido que contiene la carga. En algunas realizaciones, un "fluido de carga" se expone a una resina de purificación. En algunas formas de realización, un fluido de carga es un medio de cultivo celular. Un medio de cultivo celular puede ser aclarado (por ejemplo, para eliminar las células o restos celulares).

- 45 Un "coeficiente de reparto" (Kp), como se usa en el presente documento, se refiere a la proporción de equilibrio de la concentración de producto absorbido a la resina (O) a la concentración de producto en la solución (c), en condiciones específicas de pH de la composición y a la composición de solución. El coeficiente de reparto Kp también está relacionado con las isotermas de adsorción del producto. El coeficiente de reparto Kp corresponde a la pendiente de la isoterma de adsorción del producto a concentraciones muy bajas de solución. Se relaciona con la capacidad máxima de la siguiente manera: $Kp = Q/C = Q_{m\acute{a}x}/k_d$ donde $Q_{m\acute{a}x}$ es la capacidad máxima de la resina para el producto y k_d es la constante de disociación para interacción «resina-producto». En algunas realizaciones, un coeficiente de reparto se mide con una técnica de unión por lotes. Otras técnicas, tales como la cromatografía isocrática, también se pueden utilizar.

- 55 Una "proteína" o "polipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula que comprende una cadena secuencial de aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces peptídicos. El término se utiliza para referirse a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, pero un experto en la técnica entenderá que el término no se limita a cadenas largas y se puede referir a una cadena mínima que comprenda dos aminoácidos unidos entre sí a

través de un enlace peptídico. En algunas realizaciones, una proteína tiene una cadena que comprende más de 5, 10, 20, 50, 100, o 200 aminoácidos. Una proteína puede incluir una o más cadenas de aminoácidos distintas. Las proteínas incluyen proteínas producidas de forma natural o proteínas recombinantes producidas en células procariotas o eucariotas (por ejemplo, células primarias o líneas celulares).

- 5 Una "unidad de purificación", como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad física que se puede utilizar para llevar a cabo un modo de purificación, por ejemplo, en un sistema de purificación en tándem. En algunas realizaciones, una unidad de purificación es un recipiente (por ejemplo, una columna) que comprende una resina. En algunas realizaciones, una unidad de purificación es un filtro. Las técnicas de purificación en la presente memoria se pueden practicar en la columna, membrana, y/o formatos de adsorción de lechos expandidos, por ejemplo.
- 10 Una "resina", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia que se puede utilizar para la separación de un producto de una impureza. En algunas realizaciones, una resina es una resina que se une a inmunoglobulinas, (por ejemplo, una resina de proteína A). En algunas realizaciones, una resina es una resina de intercambio iónico (por ejemplo, una resina de intercambio aniónico, o una resina de intercambio catiónico).
- 15 Un "producto inmunofarmacéutico modular pequeño" o "SMIP™", se refiere a un dominio de unión-proteína de fusión de inmunoglobulina que tiene un dominio de unión para una estructura afín tal como un antígeno, a una región bisagra de inmunoglobulina (que puede o no puede incluir sustituciones aminoacídicas relativas a una secuencia de tipo salvaje) y a dominios C_{H2} y C_{H3} de inmunoglobulinas. Productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños se describen, por ejemplo, en las Publicaciones de Patentes de los EE.UU. 2003/133939, 2003/0118592, 2005/0136049 y WO 02/056910, WO 2005/037989 y WO 2005/017148.
- 20 Un "modo de partición débil", como se usa en el presente documento, se refiere a una técnica de separación de preparación de productos en la que al menos un producto contenido en la preparación y al menos un contaminante o impureza, se unen ambos a una resina cromatográfica. La unión de producto en el modo de partición débil es de al menos 1 mg de producto por ml de resina cromatográfica o medio cromatográfico. En general, el coeficiente de reparto de productos para el modo de partición débil es al menos 0,1. Un "modo de partición débil" es un funcionamiento isocrático. La separación usando un modo de partición débil se describe en la Publicación de los EE.UU. N.º: 2007/0060741.

Descripción detallada de ciertas realizaciones

Procedimientos y sistemas en tándem

- 30 La presente descripción proporciona procedimientos y sistemas en los que dos o más unidades de purificación se realizan en tándem, es decir, de tal forma que un fluido de carga puede estar expuesto a múltiples unidades de purificación en serie. En algunas realizaciones, un sistema de purificación incluye una primera resina y una segunda resina, en el que la segunda resina es una que puede funcionar en un modo de partición débil (por ejemplo, una resina de intercambio iónico). Un sistema en tándem ejemplar se muestra en la Figura 1. En este sistema ejemplar, una columna de proteína A, una columna de AEX y un filtro VRF están vinculados.
- 35 Las válvulas en un sistema en tándem pueden colocarse a fin de permitir cualquier combinación de unidades de purificación para operar en línea. Por ejemplo, las válvulas colocadas aguas abajo de una primera resina pueden permanecer cerradas mientras que un fluido de carga se aplica a la primera resina y se abre después de que la primera resina se lava. Un fluido que pasa a través de una unidad de purificación puede dirigirse a las unidades de purificación posteriores (por ejemplo, para lavar, equilibrar, cargar, o eluir a partir de una unidad de purificación posterior) o descartarse, como se desee. Las unidades de purificación se pueden lavar y/o regenerar por separado (por ejemplo, con un fluido dirigido solamente a través de la unidad individual, o con un fluido desde una unidad aguas arriba), según sea necesario y/o según se desee por el médico. En algunas realizaciones, un sistema proporcionado en este documento es un sistema de lecho móvil simulado.
- 40 El funcionamiento de múltiples unidades de purificación en serie puede producir niveles indeseables de presión o cambios en la presión dentro del sistema. La acumulación de presión puede ser aliviada por varios enfoques. Las bombas pueden colocarse para promover el flujo antes, entre, y/o después de una o más unidades de purificación. Los fluidos pueden tratarse para reducir la viscosidad y/o eliminar las impurezas que puedan precipitar, interferir con el flujo y provocar un aumento de la presión en el sistema. En algunas realizaciones, un fluido en el sistema se calienta para reducir la viscosidad. En algunas realizaciones, un eluato de la primera unidad de purificación se calienta para reducir la viscosidad.
- 45 Para eliminar las impurezas que pueden precipitar durante la operación de un sistema en tándem, un fluido de carga o fluido aguas abajo se puede tratar para separar las sustancias del fluido. En algunas realizaciones, se utiliza un floculante polimérico. Los ejemplos de floculantes poliméricos incluyen sulfato de protamina, quitosano, DEAE-dextrano, polímeros basados en acrilamida, polietilimina y amina de polietileno. En algunas realizaciones, una combinación de un catión y un anión que forma una sal insoluble se utiliza para eliminar las impurezas de un fluido, por ejemplo, un catión y el anión que forma una sal que tiene una constante de producto de solubilidad de menos de 1×10^{-4} (por ejemplo, CaPO₄). Los procedimientos de eliminación de impurezas se describen, por ejemplo, en la Publicación de los Estados Unidos N.º: 2007/0066806. La eliminación de sólidos también se puede lograr mediante filtración. Se

puede utilizar uno cualquiera de los procedimientos o combinación de los mismos para la eliminación de impurezas precipitantes. En algunas formas de realización, un fluido de carga (por ejemplo, medio de cultivo) se trata para eliminar las impurezas que pueden precipitar, antes de la exposición a una primera resina.

5 Muchas implementaciones de procedimientos de purificación de proteínas utilizan inactivación de virus o etapas de eliminación. Un procedimiento para la inactivación de los virus es bajar el pH de un fluido. En algunas realizaciones, por ejemplo, realizaciones en las que el pH bajo no es compatible con una etapa de purificación vecina, se eliminan los virus haciendo pasar un fluido a través de un filtro de reducción de virus y/o por inactivación por detergente. Cualquiera de una variedad de detergentes se puede utilizar para la inactivación de virus, por ejemplo, Tween o Tritón X-100. En algunas formas de realización, un fluido de carga (por ejemplo, medio de cultivo) se trata para eliminar o inactivar los virus antes de la exposición a una primera resina.

Partición débil

15 En diversas realizaciones de los procedimientos proporcionados en este documento, una o más etapas de purificación utilizan cromatografía en un modo de partición débil. En el modo de partición débil, un fluido que contiene el producto se hace pasar a través de una resina, con tanto el producto como las impurezas uniéndose a la resina. Sin embargo, las impurezas se unen más estrechamente que el producto. Según continúa la carga, el producto no unido pasa a través de la resina y se recupera en el efluente de la columna. En algunas realizaciones, se lava una resina (por ejemplo, con un lavado isocrático) para recuperar producto adicional débilmente unido.

20 Un modo de partición débil se define por las condiciones en las que se une una resina de al menos 1 mg de producto por ml de resina (por ejemplo, al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, o 60 mg por ml). Un modo de partición débil también se define por un coeficiente de reparto (K_p) de al menos 0,1. En algunas realizaciones, la operación en un modo de partición débil comprende operar en condiciones definidas por una K_p en el intervalo de aproximadamente 0,2 a 20 (por ejemplo, 0,2-10, o 0,5 a 5). En contraste con la partición débil, un modo de unión-elución se define típicamente por una K_p por encima de 20 y emplea un cambio en la composición del tampón después de causar la elución del producto. Un modo de circulación se define típicamente por un $K_p < 0,1$ y emplea un lavado isocrático para recuperar el producto.

25 K_p se calcula a partir de experimentos de unión por lotes como la proporción de la concentración proteica adsorbida frente a las concentraciones proteicas libres en el equilibrio. K_p es una función del pH y la concentración de iones en tampones de equilibrado, carga y lavado. En algunas realizaciones, para un modo de partición débil, una etapa AEX se hace funcionar entre $K_p = 1$ y $K_p = 3$ (véase la Publicación de los Estados Unidos. N.º: 2007/0060741 y Kelley BD, Tobler SA, Brown P, Coffman JL, Godavarti R, Iskra T, Switzer M, Vunnum S. Biotechnol Bioeng. 15 de octubre 2008;101(3): 553-66).

Condiciones de funcionamiento adecuadas para la partición débil dependen de la elección de la resina seleccionada para la purificación del producto. Las condiciones pueden incluir los niveles de pH y las fuerzas iónicas, las concentraciones de sales y/o los niveles de excipientes.

35 En algunas formas de realización, las condiciones para la partición débil se identifican mediante cribado. El cribado puede incluir estudios de unión por lotes o estudios de unión a columnas. Los estudios de unión a columnas podrían incluir estudios de elución de gradiente o estudios de elución isocrática. Por ejemplo, un experto en la técnica puede determinar que tampón o sal es apropiado para la proteína particular que se está purificando y para las condiciones de funcionamiento que se están identificando. Una concentración óptima del tampón seleccionado o la sal seleccionada se puede determinar a continuación, por ejemplo, corriendo un gradiente del tampón seleccionado o de la sal seleccionada a través de una columna a la que se ha aplicado un fluido de carga que comprende el producto a purificarse y las impurezas. Las fracciones del efluente de la columna pueden recogerse y analizarse para determinar la concentración del tampón o sal en la que la unión del producto es de al menos 1 mg de producto por ml de resina o, alternativamente, en la que el coeficiente de reparto para el producto es de al menos 0,1. En algunas formas de realización, el coeficiente de reparto se mide entre 1 y 10 mg/ml de prueba de carga con una proporción de fase (volumen de líquido frente a volumen de resina) de tres a seis en un experimento de unión por lotes.

40 Una vez que se determinan las condiciones de funcionamiento, las condiciones del fluido a aplicarse a una resina en condiciones de partición débiles (por ejemplo, un eluato de una resina anterior tal como la proteína A) se pueden ajustar de acuerdo con ello como se describe en el presente documento. Después de que el fluido se hace pasar a través de la resina, la resina se lava opcionalmente con un volumen de lavado esencialmente isocrático. El producto purificado se puede obtener de cualquier lavado esencialmente isocrático y se agrupó con el producto purificado a partir de efluente de la columna durante el ciclo de carga. Después de la etapa de lavado opcional, la resina opcionalmente se puede retirar y regenerar, por ejemplo, para minimizar la acumulación de impurezas en la superficie de la fase sólida y/o para esterilizar la resina para evitar la contaminación del producto con microorganismos.

55 Altas concentraciones de carga y altos volúmenes de carga son posibles con el modo de partición débil. En una realización, la concentración de producto en el fluido de carga es de al menos 1 mg de producto por ml de fluido de carga, en otra realización, la concentración de producto en el fluido de carga es de al menos 5 mg de producto por ml de fluido de carga, en otra realización, de al menos 50 mg de producto por ml de fluido de carga y en otra realización,

de al menos 100 mg de producto por ml de fluido de carga. El producto purificado se puede recuperar de hasta 50 CV de fluido de carga pasado a través de la resina.

5 Con el fin de obtener la formulación precisa en los modos de cromatografía por lotes tradicionales, la valoración de un eluato de una primera resina (por ejemplo, una resina de proA) puede requerir el uso de bombas controladas por retroalimentación de pH o por bombas de entrega de proporciones de tampones programadas. Los procedimientos proporcionados en el presente documento añaden robustez a procedimientos de purificación y pueden eliminar la necesidad de mecanismos de control más complejos.

10 En ciertas realizaciones de procedimientos de purificación en tándem proporcionados en este documento, el producto se recupera de una primera resina en un fluido que comprende un tampón. En algunas realizaciones, un cambio de pH se produce a medida que fracciones anteriores de un eluato de la primera resina se mezclan con un reactivo de valoración. Se ha descubierto que las condiciones pueden ser tales que, aunque el eluato valorado presenta una oscilación de pH, el tampón en las fracciones posteriores del eluato mitiga los efectos negativos de una oscilación de pH en la realización de la segunda resina.

15 Por ejemplo, se encontró que el pH al final de una elución proA determina la calidad del producto y la recuperación de la reserva en tándem, siempre y cuando el pH disminuya consistentemente en el transcurso de la elución. A la inversa, pH superior al óptimo en el comienzo de una elución proA tendría efecto mínimo en la calidad y la recuperación del producto. Por consiguiente, en algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan procedimientos que incluyen el funcionamiento de un procedimiento de proA-AEX en tándem a pesar del pH variable. En algunas realizaciones, las velocidades de bombeo en tales procedimientos no necesitan variar.

20 Como se señaló anteriormente, un coeficiente de reparto, K_p , está relacionado con el pH y la composición de solución (por ejemplo, la fuerza iónica y la composición del tampón). Se ha descubierto que añadir sal a un reactivo de valoración que se utiliza para preparar un fluido para la exposición a una resina de intercambio iónico incrementa la robustez de la de la purificación manteniendo un grado constante de fuerza de unión a lo largo de un intervalo de proporciones de valoración. Este principio es aplicable a los procedimientos en tándem y no en tándem.

25 En realizaciones adicionales, una purificación en tándem (por ejemplo, proA-AEX) se puede diseñar en un intervalo de proporciones de neutralización (v) de eluato frente a reactivo de valoración que da como resultado un cambio en K_p (k) hasta ser menos que una cierta cantidad. Una ventana de funcionamiento robusto independiente de K_p y v se puede describir como una función de k como sigue:

30 $k = \text{ABS}[K_p(v + \Delta v) - K_p(v - \Delta v)] / K_p(v)$, %, que mide un cambio de % absoluto en K_p dentro de un intervalo de funcionamiento dado ($v \pm \Delta v$).

35 Por ejemplo, en algunas formas de realización, se lleva a cabo proA-AEX en tándem en un intervalo de proporciones de neutralización (V) y una combinación de parámetros que dan como resultado el cambio relativo en K_p (k) por debajo del 100 % cuando v se varió del 50 % al 150 % de la meta. En algunas formas de realización, se lleva a cabo proA-AEX en tándem en condiciones donde $k < 50$ %, en el intervalo del 75 % al 125 % del objetivo v . En algunas realizaciones, las condiciones dan como resultado $k < 20$ %, en el intervalo del 90 % al 110 % del objetivo v .

40 Otro aspecto para mejorar procedimientos de purificación proporcionados en el presente documento se refiere a condiciones en las que las proteínas se eluyen a partir de proA. Se ha descubierto que la adición de un tampón que tiene una pK_a alta (por ejemplo, 5,5 o más) a un tampón de elución proA ácido proporciona resistencia a las variaciones en el pH durante la neutralización posterior con un reactivo de valoración, por ejemplo, en la preparación para aplicación a una resina de intercambio aniónico. Los tampones que tienen una pK_a de 5,5 o más se enumeran en la Tabla A. Cualquiera de estos puede utilizarse en un tampón de elución de proteína A.

Tabla

Tabla A. Valores de pK_a de bases

Ácido o base libre	Peso molecular	pK_a a 25 °C
Bencenohecarboxílico (mellítico)	342,17	5,50 (pK_{a5})
2,2-dimetilglutárico	160,17	5,51 (pK_{a2})
Itacónico	130,1	5,55 (pK_{a2})
Ciclopentanotetra-1,2,3,4-carboxílico	246,17	5,57 (pK_{a3})
Succínico	118,09	5,57 (pK_{a2})
Benceno-1,2,4,5-tetracarboxílico (piromellítico)	254,15	5,61 (pK_{a4})

Ácido o base libre	Peso molecular	pKa a 25 °C
Benceno-1,2,3-tricarboxílico (hemimellítico)	246,18	5,87 (pK _{a3})
Dimetilmalónico	132,12	5,98 (pK _{a2})
Histidina	156,16	6,00 (pK _{a2})
Hidroxilamina	34,0	6,03
Carbónico (H ₂ CO ₃ + CO ₂)	62 (CO ₂)	6,10 (pK _{a1})
Malónico	104,06	6,10 (pK _{a2})
Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico "MES"	195,2	6,15 (pK _{a2})
Glicerofosfórico	172,08	6,19 (pK _{a2})
Propano-1,2,3-tricarboxílico (tricarbalílico)	176,12	6,20 (pK _{a3})
Bencenopentacarboxílico	298,16	6,25 (pK _{a5})
Maleico	116,07	6,26 (pK _{a2})
2,2-dimetilsuccínico	146,14	6,29 (pK _{a2})
EDTA	292,24	6,30 (pK _{a3})
3,3-dimetilglutárico	160,17	6,31 (pK _{a2})
Bis(2-hidroxietyl)imino-tris(hidroxietyl)metano "BIS-TRIS"	209,24	6,46
Bencenohexacarboxílico (mellítico)	342,17	6,59 (pK _{a6})
Ácido N-(2-acetamido)imino-diacético "ADA"	190,17	6,60 (pK _{a3})
Butano-1,2,3,4-tetracarboxílico	234,12	6,63 (pK _{a4})
Pirofosfórico	177,98	6,68 (pK _{a3})
1,1-ciclopentanodiacético (ácido 3,3-tetrametilenglutárico)	186,21	6,70 (pK _{a2})
1,4-piperazina-bis-(ácido etanosulfónico) "PIPES"	302,37	6,8 (pK _{a4})
Ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico "ACES"	182,20	6,9 (pK _{a2})
1,1-ciclohexanodiacético	200,18	6,94 (pK _{a2})
3,6-endometileno-1,2,3,6-tetrahidroftálico "EMTA"	183,62	7,00 (pK ₂)
Imidazol	68,08	7,00
2-(aminoetyl)trimetilamonio "COLAMINA"	156,69	7,10
Ácido N,N-bis(2-hidroxietyl)-2-aminoetanosulfónico "BES"	213,25	7,15 (pK _{a2})
2-metilpropano-1,2,3-triscarboxílico	190,15	7,20 (pK _{a3})
Ácido 2-(N-morfolino)propano-sulfónico "MOPS"	209,27	7,20 (pK _{a2})
Fosfórico	98,0	7,21 (pK _{a2})
Ácido N-tris(hidroxietyl)metil-2-aminoetanosulfónico "TES"	229,28	7,50 (pK _{a2})
N-2-hidroxietyl piperazina-N'-2-etanosulfónico "HEPES"	238,31	7,55 (pK _{a2})
2-hidroxietyl imino-tris(hidroxietyl)metano "MONO-TRIS"	165,18	7,83
Tetrahidrato de brucina	466,53	7,95 (pK _{a2})

Acido o base libre	Peso molecular	pKa a 25 °C
Acido 4-(2-hidroxietil)sulfónico-1-piperazinapropano "EPPS"	252,23	8,00
Tris(hidroximetil)aminometano "TRIS"	121,14	8,10
N-tris(hidroximetil)metilglicina "TRICINA"	180,18	8,15
Glicinamida	74,04	8,20
N,N-bis(2-hidroxietil)glicina "BICINA"	163,18	8,35
Acido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminopropanosulfónico "TAPS"	243,3	8,40 (pKa ₂)
N-glicil-glicina	132,12	8,40
Histidina	155,16	9,17 (pKa ₃)
Bórico	43,82	9,24
Pirofosfórico	177,98	9,39 (pKa ₄)
Etanolamina	61,08	9,44
Glicina	75,07	9,60 (pKa ₂)

Resinas

5 Diversas combinaciones de resinas se pueden utilizar en los procedimientos (por ejemplo, procedimientos de purificación en tándem) proporcionados en el presente documento, incluyendo resinas de unión-elución, resinas de intercambio aniónico, resinas de exclusión por tamaño, resinas de interacción hidrófoba, resinas de afinidad por metales inmovilizados y resinas de hidroxiapatita.

Resinas de intercambio aniónico que se pueden utilizar incluyen resinas que tienen sustituyentes tales como dietilaminoetilo (DEAE), trimetilaminoetilo (TMAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y grupos de aminas cuaternarias (O).

10 Resinas de intercambio catiónico que se pueden utilizar incluyen resinas que tienen sustituyentes tales como carboximetilo (CM), sulfoetilo (SE), sulfopropilo (SP), fosfato (P) y sulfonato (S).

15 En algunas realizaciones, se utiliza una resina de intercambio iónico celulósica (por ejemplo, DE23, DE32, DE52, CM-23, CM-32 o CM-52, disponible de Whatman Ltd. Maidstone, Kent, Reino Unido). Intercambiadores iónicos basados en Sephadex y reticulados utilizados para la purificación incluyen, por ejemplo, DEAE-, QAE-, CM- y SP-Sephadex y DEAE, Q-, CM y S-Sefarosa y Sefarosa (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Copolímeros de etilenglicol-metacrilato derivatizado de DEAE y CM tales como TOYOPEARL™ DEAE-650S o M y TOYOPEARL™ CM-650S o M están disponibles de Toso Haas Co., Filadelfia, Pa.

20 Las columnas de cromatografía de proteína A comercialmente disponibles incluyen, por ejemplo, PROSEP-A™ (Millipore, Reino Unido), FAST FLOW™ de Proteína A Sefarosa (GE Healthcare, Piscataway, NJ), TOYOPEARL 650M™ Proteína A (TosoHass Co., Filadelfia, Pa.) y columnas MabSelect™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

25 En algunas realizaciones, una resina de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) se utiliza para purificación. HIC separa moléculas en base a la hidrofobicidad. Generalmente, las moléculas de muestras en un tampón salino alto están cargadas en la resina de HIC. La sal en el tampón interacciona con las moléculas de agua para reducir la solución de las moléculas en solución, exponiendo de esta manera las regiones hidrófobas en las moléculas de la muestra que consecuentemente se absorben por el medio de HIC. Cuanto más hidrófoba es la molécula, menos sal se necesita para promover la unión. Las interacciones de unión entre las moléculas de producto y un medio de HIC por lo tanto dependen de condiciones tales como pH, fuerza iónica y concentraciones salinas del medio. Resinas de HIC disponibles comercialmente que se pueden utilizar incluyen resinas que comprenden una matriz base (por ejemplo, agarosa reticulada o material copolimérico sintético) a la que se acoplan ligandos hidrófobos (por ejemplo, grupos, alquilo o arilo). Los ejemplos incluyen FENILSEFAROSA™, 6 FAST FLO™ (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); FENILSEFAROSA™ de alta resolución (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); OCTILSEFAROSA™ de alta resolución (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); Fractogel™ EMD Propilo o FRACTOGEL™ EMD Fenilo (E. Merck, Alemania); Soportes de Metilo MACRO PREPT™ o de t-butilo MACRO-PREP™ (Bio-Rad, CA); WP HI-Propilo (C₃)™ (JT Baker, NJ); y éter, fenilo o butilo de TOYOPEARL™ (TosoHaas, Pa.). HIC se puede realizar en un modo de partición débil.

30

35

En algunas realizaciones la cromatografía de hidroxapatita se utiliza para la purificación. La cromatografía de hidroxapatita utiliza un fosfato de calcio hidroxilado insoluble de la fórmula $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, tanto la matriz como el ligando. Los grupos funcionales consisten en pares de iones de calcio cargados positivamente (sitios C) y racimos de grupos fosfato cargados negativamente (sitios P). Las interacciones de unión entre un producto y un medio de hidroxapatita dependen de las condiciones tales como el pH, la fuerza iónica y las concentraciones de excipientes, tales como concentraciones de fosfato, las concentraciones de calcio, las concentraciones de arginina, las concentraciones de glicina y las concentraciones de HEPES del medio. Diversas resinas cromatográficas de hidroxapatita están disponibles comercialmente. La cromatografía de hidroxapatita se puede realizar en un modo de partición débil.

En algunas realizaciones, se usa una resina de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) para purificación. IMAC se basa en la interacción entre iones de metales de transición quelados inmovilizados en una resina y cadenas laterales de imidazol de residuos de histidina sobre un producto marcado de interés. La separación de las moléculas se produce como resultado de la competición entre el producto marcado de interés y contraligandos para grupos metálicos en la resina de IMAC. Las interacciones de unión entre un producto y medio IMAC cargado de metal dependen de las condiciones, tales como los niveles de contraligandos, tales como las concentraciones de imidazol y la fuerza iónica del medio. Diversas resinas de IMAC están disponibles comercialmente. IMAC puede realizarse en un modo de partición débil.

La purificación usando cualquiera de las resinas anteriores puede ocurrir en condiciones conocidas por los expertos en la técnica y en combinación con procedimientos de la invención proporcionados en este documento.

Por ejemplo, una resina de proA puede hacerse funcionar en una diversidad de condiciones. En algunas realizaciones, una columna de proA se lava y se equilibra con una o más soluciones antes del contacto con un fluido de carga. Tales soluciones pueden incluir, por ejemplo, un tampón (por ejemplo, Tris, MES, HEPES, histidina, o fosfato, por ejemplo, entre 1-500 mM, 25-100 mM, o 50 mM), y/o una sal (por ejemplo, NaCl, $NaPO_4$, acetato de sodio, o $CaCl_2$, por ejemplo, entre 0-2 M, o 5-250 mM). El pH de una solución de equilibrado está generalmente entre 3,5-10 (por ejemplo, pH entre 6,0-8,0).

Después de poner en contacto una resina de proA con un fluido de carga, la resina unida se puede lavar. Las soluciones de lavado pueden incluir un tampón (por ejemplo, Tris, MES, HEPES, fosfato, o histidina, por ejemplo, entre 1 y 500 mM), y/o sal (por ejemplo, NaCl, $CaCl_2$, $NaPO_4$ o acetato de sodio, por ejemplo, entre 0 y 2 M), y/o un aditivo (por ejemplo, guanidina, urea, sacarosa, arginina, o un derivado de arginina), y/o un disolvente (por ejemplo, etanol, acetonitrilo, o polietilenglicol). Las soluciones de lavado generalmente tienen un pH entre 3,5 y 10 (por ejemplo, un pH entre 4,5-8,0). En algunas realizaciones, una resina se lava con la misma solución que se utiliza para equilibrar la resina.

Los polipéptidos se pueden eluir a partir de una resina proA utilizando una etapa o el cambio de gradiente de pH, tipo de sal, concentración de sal, tipo de disolvente, concentración de disolvente, tipo de desplazador, concentración de desplazador, o una combinación de los mismos. En general, para eluir un producto de una resina proA, la resina se pone en contacto con un tampón de elución. En algunas realizaciones, un tampón de elución contiene una sal (por ejemplo, NaCl o $CaCl_2$, por ejemplo, 1 a 100 mM). En algunas realizaciones, un tampón de elución puede contener glicina, ácido acético, o ácido cítrico (por ejemplo, 20 mM-250 mM). Un tampón de elución también puede contener un tampón (por ejemplo, HEPES, por ejemplo, 10-100 mM). Un tampón de elución puede contener también ácido acético (por ejemplo, 20 mM a aproximadamente 50 mM), un aditivo (por ejemplo, guanidina, urea, o sacarosa), y/o un disolvente (por ejemplo, etanol, acetonitrilo, polietilenglicol, por ejemplo, disolvente al 1- 10%, por ejemplo, disolvente al 5 %). El pH del tampón de elución puede variar de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 4,0. En algunas formas de realización, el pH se puede cambiar (por ejemplo, gradualmente) para producir una elución de gradiente (por ejemplo, un gradiente de elución de pH 5,0 a pH 3,0). En un modo de realización preferente, el pH del tampón de elución es de aproximadamente 3,0. Un eluato se puede neutralizar, por ejemplo, mediante el ajuste de pH a 6,0-8,0 (en los casos en los que se usa un pH bajo para la elución), añadiendo un reactivo de valoración tal como se describe en este documento, después de recuperar a partir de la resina.

Productos para purificación

Los procedimientos y sistemas proporcionados en este documento pueden usarse para la purificación (por ejemplo, purificación a escala comercial) de diversos productos de interés, incluyendo proteínas que se dan en la naturaleza, proteínas de fusión, proteínas que contienen Fc, inmunoconjugados, citocinas, factores de crecimiento, receptores acoplados a proteínas G, interleucinas, hormonas y enzimas. En algunas realizaciones, una proteína que sufre purificación puede comprender uno o más dominio(s) de inmunoglobulina(s) de anticuerpo(s). En algunas realizaciones, la proteína también puede comprender un único dominio o múltiples dominios de inmunoglobulina(s) de anticuerpo(s) variable(s). Una proteína que contiene Fc puede comprender un anticuerpo. Las proteínas se pueden derivar de diversas fuentes, incluyendo líneas de células huésped procariontas o eucariotas recombinantes cultivadas.

Las proteínas (por ejemplo, anticuerpos) para la purificación de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden ser de un número de fuentes, incluyendo, pero no limitadas a, suero de animales inmunizados, fluido de ascitis, sobrenadantes de hibridomas o de mielomas, medios acondicionados derivados de

cultivar una línea celular recombinante que expresa la molécula de proteína y de extractos celulares de las células productoras de proteínas. En algunas realizaciones, se purifican proteínas de medios de cultivo celular condicionados de una diversidad de líneas celulares recombinantes de producción de proteínas. En algunas realizaciones, las proteínas son a partir de preparaciones disponibles comercialmente. En algunas realizaciones, el anticuerpo debe purificarse.

En algunas realizaciones, una proteína para la purificación de acuerdo con un procedimiento descrito en el presente documento se produce por expresión en una célula recombinante. Una amplia diversidad de células pueden utilizarse para producir una proteína recombinante. Cualquier célula que se pueda transformar con ADN recombinante para expresar una proteína de interés (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal), se puede utilizar en los procedimientos de la presente divulgación. Las células pueden ser de una diversidad de especies, por ejemplo, especies eucariotas, incluyendo fuente de plantas, levaduras, nematodos, gusanos, insectos, anfibios, o mamíferos, por ejemplo, seres humanos, primates, ovinos, bovinos, porcinos, equinos, felinos, caninos, o roedores. En realizaciones particulares, las células son de ser humano o de roedor. En realizaciones particulares, las células son de hámster (por ejemplo, células ováricas de hámster chino). Ejemplos de células de mamífero que pueden usarse incluyen línea BALB/c línea de mieloma de ratón (NSO/I, Número de ECACC: 85110503); SP2/0; Balb/c3T3; retinoblastos humanos (PER.C6 (Crucell, Leiden, Países Bajos)); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol*, 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células ováricas de hámster chino +/- DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 77: 4216 (1980)); GS-CHO, CHO-K1, CHO-K1SV, CHO-DG44, CHO-DUKX, CHO-DUXB11, CHO-S); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1980)). hibridoma de rata YB2/0 (Shinkawa et al., *J. Biol. Chem.* 278: 3.466 a 3.473, 2003); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals NY Acad. Sci.*, 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Un número de líneas celulares adecuadas se puede obtener de depositarios tales como la Colección de Cultivos Tipo de EE.UU. (ATCC), Manassas, Va. Ejemplos de células de plantas que pueden usarse incluyen células de *Lemna minor* (lenteja de agua), *Arabidopsis thaliana* y *Physcomitrella patens* (musgo). Ejemplos de células de insectos que se pueden usar incluyen células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9 y Sf21), *Trichoplusia ni* (Tni y BTI-Tn 5B1-4) y *Mamestra brassicae* (Mb). Células de hongos útiles incluyen células de *Pichia pastoris* y células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Ejemplificación

Ejemplo 1. Funcionamiento en tándem de una etapa de proteína A, una etapa cromatográfica de intercambio aniónico (AEX) y un filtro de reducción de virus (VRF)

Un funcionamiento en tándem (Figura 1) de una columna de proteína A, una columna de AEX (hecha funcionar en modo de partición débil) y un filtro de reducción de virus (VRF) se llevó a cabo a escala de laboratorio para la purificación de anticuerpos monoclonales y productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños. Bombas A y B funcionan a una proporción constante de caudales. Un mezclador asegura una mezcla minuciosa del efluente de ProA suministrado por la bomba A con 5 al 20 % v/v de reactivo de valoración entregado por la bomba B. Las válvulas 1-3 permiten cualquier combinación de funcionamientos unitarios para estar en línea durante el procedimiento. Por ejemplo, durante la carga de proA y las etapas de lavado, solamente la columna de Proa está en línea y la bomba B está inactiva. Después de un volumen de columna proA (CV) del lavado de proA de pH alto/sales bajas final, las válvulas 2 y 3 se abren y la bomba B comienza a añadir un tampón de neutralización (reactivo de valoración) al efluente proA, que se utiliza para equilibrar el AEX y VRF. Las tres operaciones unitarias permanecen en línea durante la elución a pH bajo y una parte de lavado proA post-elución, tal como el efluente proA está neutralizándose y se usa como un lavado TMAE. Alternativamente, el lavado de post-elución de la columna de proA puede dirigirse a los residuos y TMAE puede lavarse con un tampón dedicado. Las columnas de proA y de AEX se regeneran por separado. Sin embargo, el tampón de almacenamiento que contiene etanol se puede aplicar a ambas columnas en tándem.

Un ejemplo de un cromatograma de proA-AEX-VRF en tándem, que representa UV, pH y trazas de presión durante la elución, se muestra en la Figura 2. Los cambios bruscos en la presión se debieron a la conmutación de los componentes del sistema de encendido y apagado. El aumento gradual de la presión durante la elución correlacionó con el ápice del pico que pasa a través de la membrana de VRF, como se muestra en la Figura 3. Después de la elución, la presión a través del VRF volvió a casi el nivel de pre-elución, lo que sugiere que el aumento de presión se había debido a la viscosidad del pico del producto y no a obstrucción de la membrana.

Un procedimiento en tándem con tres operaciones unitarias se ejecutó con éxito para una serie de anticuerpos monoclonales (MAb) y productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP™), lo que demuestra la viabilidad de la neutralización en línea. Sorprendentemente, el sistema no experimentó contrapresiones inaceptablemente altas debidas a precipitación de pico de proA. No se observó ningún aumento de presión con reutilización, lo que apunta a la ausencia de ensuciamiento.

Ejemplo 2. Un procedimiento de proA-AEX en tándem con una carga de proA floculada

La precipitación del producto, HMW y otras impurezas a menudo se produce durante la elución de pico de proA y neutralización. Este procedimiento es difícil de controlar. Los sólidos deben retirarse de la corriente del procedimiento, ya que su presencia provoca el ensuciamiento de la resina de AEX. En algunas formas de realización, la eliminación se lleva a cabo por filtración a través de un filtro de 0,2 μm .

- 5 La nucleación y el crecimiento de partículas sólidas es un proceso controlado cinéticamente que a veces lleva horas para proseguir hasta su finalización. La duración de la nucleación no afecta a una cromatografía por lotes regulares, ya que hay un lapso de tiempo significativo entre neutralización de reserva pico de proA y cargado de AEX. Sin embargo, en un funcionamiento en tándem (por ejemplo, como se muestra en la Figura 1), la precipitación se puede producir aguas abajo del filtro de 0,2 μm , lo que sería perjudicial para la columna de AEX y/o el VRF. Además, se espera que la neutralización del ápice del pico de proA según se mueve a través del mezclador produzca una banda concentrada de material precipitado, que pueda conectar el filtro u otros componentes aguas abajo. Por lo tanto, ciertas etapas pueden introducirse aguas arriba de la columna de proA que minimizaría la precipitación del pico proA neutralizado.

- 15 Se descubrió que la floculación de medios acondicionados por separado, o en combinación con la filtración de la almohadilla de concentrado, redujo significativamente la turbidez en el ápice del pico de proA tras la neutralización. Aunque la turbidez por sí misma no es un indicador preciso de taponamiento, sirve como una medida indicadora adecuada de concentración de sólidos. Reducir la turbidez, la floculación y la filtración podría haber permitido la neutralización en línea, ya que era posible procesar el material floculado sin una contrapresión excesiva. En el experimento descrito a continuación, el medio condicionado previamente filtrado en lecho corto se floculó mezclando con CaCl_2 30 mM, K_2HPO_4 30 nM, HEPES 40 mM pH 7,5 durante 1 hora seguido de centrifugación para eliminar los sólidos formados. En comparación con un control, el material floculado produjo fracciones de pico proA mucho más limpias (Figuras 4A y 4B). Todos los experimentos en tándem descritos en los presentes ejemplos usaron CM floculado de esta manera. Otros procedimientos de floculación, tales como el uso de polietilimina (PEI) u otros floculantes también se pueden utilizar. Alguien puede especular que tanto la floculación como la filtración en lecho corto son procedimientos ortogonales de eliminación de los componentes del medio acondicionado hidrófobos, tales como lípidos, que son propensos a la agregación a concentración elevada y durante un cambio de pH.

Ejemplo 3. Un funcionamiento en tándem en el que la carga de proA se trata con la mezcla de disolvente-detergente para inactivar virus con cubierta

- 30 En algunas realizaciones de los procedimientos de purificación en tándem proporcionados en este documento, mantener a pH bajo para la inactivación vírica no se utiliza, ya que, en algunas realizaciones, un efluente proA se neutraliza continuamente a medida que se mueve a través de un mezclador. Por lo tanto, puede ser necesaria una etapa de reemplazo para la inactivación de virus con cubierta. La presente divulgación aporta que una etapa de inactivación vírica por disolvente/detergente pueda incorporarse después de la eliminación celular por centrifugación, pero antes de pasar a través de una columna proA. Tal colocación de la etapa es beneficiosa porque la proA es una etapa de unión y elución que es capaz de eliminar detergentes en la circulación y en los lavados. No se espera que una etapa de AEX de partición débil elimine detergentes por absorción preferencial. La eliminación del detergente por etapa de UF/DF también será ineficaz, ya que las grandes micelas (> 70 kDa de Tritón X-100) serán retenidas por la membrana. Al mismo tiempo, el detergente no se debe añadir antes de la eliminación de células, ya que causa lisis celular y libera ADN viscoso y otras impurezas.

- 40 En todos los experimentos descritos en los presentes ejemplos, se añadió Tritón X-100 al 0,5 % p/v o al 0,25 % p/v a medio acondicionado floculado. La presencia de detergente no tuvo impacto en el rendimiento de las etapas cromatográficas. La concentración de Tritón X-100 en las fracciones de los picos en tándem se midió mediante HPLC en fase reversa. El detergente se eliminó en gran parte a través del funcionamiento en tándem: desde el 0,5 % p/v en la carga hasta el 0,0135 % p/v en el ápice del pico, una reducción logarítmica de 1,5.

Ejemplo 4. Funcionamiento en tándem de proA y una cromatografía de AEX con valoración de la corriente de producto desde el pico de proA

- Este ejemplo describe una valoración de la corriente de producto desde el pico proA según este eluye a partir de la columna con una relación volumétrica fija de una solución de pH alto. Esto lleva a la corriente del proceso resultante a un intervalo específico de los niveles de pH y de los niveles de concentración de sales que promueve cromatografía de partición débil en el AEX.

- 50 La cromatografía de AEX de partición débil requiere una fase móvil formulada con precisión para lograr la retención de impurezas de unión más fuerte, tales como especies de alto peso molecular (HMW) y proteínas de la célula huésped (HCP) a expensas de un producto de unión más débil. La fuerza de unión se determina por un coeficiente de reparto termodinámico, K_p , que se calcula a partir de experimentos de unión por lotes como la proporción de la concentración de proteína libre para liberar concentraciones de proteínas en el equilibrio. K_p es una función del pH y la concentración de aniones (típicamente, $[\text{Cl}^-]$) en los tampones de equilibrado de AEX, de carga y de lavado. La función $K_p = f(\text{pH}, [\text{Cl}^-])$ se deriva empíricamente a partir de experimentos de unión por lotes.

En el modo de cromatografía tradicional por lotes, un pico proA se eluye con un tampón de pH bajo, que contiene glicina como un agente tamponante y la sal (NaCl), que es una fuente de iones cloruro principal que controlan la fuerza

de unión a AEX aguas abajo. El pico agrupado se valora con un agente neutralizante concentrado (tampón Tris de pH alto) hasta que se alcanza el pH deseado. Por lo tanto, el K_p de la carga de AEX está controlado por la formulación exacta y la valoración del tampón de elución de proA. En una disposición en tándem tal como el mostrado en la Figura 1, las bombas de A y B pueden sincronizarse para entregar una proporción variable preprogramada de tampones. Alternativamente, la bomba B puede controlarse por una retroalimentación a partir de un medidor de pH después del mezclador. Estas realizaciones pueden generar un pH constante por toda la carga de AEX, pero pueden ser muy costosas de implementar y validar en una planta de fabricación.

En un ejemplo de un procedimiento en tándem proporcionado por la presente divulgación, las bombas funcionan a una proporción constante o cerca de la constante de caudales. El pH de la corriente de elución es variable, dado que el tampón de lavado de proA final de pH alto está reemplazándose con un tampón de elución de pH bajo según este surge de la columna de proA. Además, tanto los ligandos de proA como el producto adsorbido tienen residuos valorables, que captan ácido en el tampón de elución. Esto hace que el pH de la elución de proA disminuya detrás del pico del producto. Por lo tanto, la composición de la corriente de elución de proA cambia a partir del tampón de lavado 2 de proA para el tampón de elución sin ninguna capacidad tamponadora en el borde delantero del pico al tampón de elución no modificado en el extremo de final del pico. Como consecuencia, cuando el efluente proA se mezcla con una proporción constante de tampón de neutralización de pH alto, la señal de pH muestra una oscilación de pH. La Figura 5 es un análisis fuera de línea de la concentración y el pH de un pico de proA fraccionado que muestra esta oscilación de pH. Si las bombas proporcionan caudales constantes, el pH resultante cambiará a lo largo del curso de la elución de proA.

Como se muestra en la Figura 5, un experimento de valoración de tampón fuera de línea predijo correctamente que el pH final del tampón de elución valorado se estabilizaría en \sim pH 7,9. Las primeras fracciones del tampón de elución estaban casi desprovistas de ácido y como consecuencia, llegaron a sobre-valorarse con el tampón de neutralización. La desviación de pH resultante a pH 8,3 se produjo durante el ápice del pico. Esta desviación del pH causaría una unión más estrecha de las fracciones pico de proA afectadas a la columna de AEX que funciona en un modo de partición débil, afectando de este modo negativamente a la recuperación del producto. Sorprendentemente, las fracciones posteriores del tampón de elución contenían suficiente capacidad de tamponamiento y por lo tanto se neutralizaron al nivel de pH esperado, causando desorción de producto adicional unido antes y dando como resultado rendimiento aceptable. La columna de AEX funcionó exitosamente en la eliminación de HCP y filtró proteína A a niveles aceptables, a pesar de que el pH varió significativamente. Por lo tanto, el tándem proA/TMAE permitió el uso de cromatografía de partición débil, a pesar de que el pH osciló ampliamente durante la operación de la TMAE.

Se encontró que solo el pH al final de la elución proA determina la calidad del producto y la recuperación de la reserva en tándem, siempre y cuando el pH disminuya consistentemente en el transcurso de la elución. A la inversa, pH por encima del óptimo en el comienzo de la elución proA tendría un efecto mínimo en la calidad y la recuperación del producto. Por consiguiente, en algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan procedimientos que incluyen el funcionamiento de un procedimiento de proA-AEX en tándem a pesar del pH variable. En algunas realizaciones, las tasas de bombeo en tales procedimientos son constantes.

Ejemplo 5. El uso de un reactivo de valoración que es básico y contiene sal para la operación en tándem de cromatografía de ProA y cromatografía de AEX

El uso de un reactivo de valoración para el funcionamiento en tándem de la proteína A y AEX, que tanto es básico (niveles de pH de aproximadamente 0,5 unidades de pH por encima del funcionamiento de la etapa de AEX y los niveles de concentración de tampón entre 100 mM y 2 M) como contiene sal, se examinó. Las condiciones se diseñaron de tal forma que la adición del reactivo de valoración tanto aumentó el pH del proceso intermedio como aumentó de la fuerza iónica del procedimiento intermedio de una manera tal como para mantener constante (o casi constante) la unión (medida por métricas como K_p , el coeficiente de reparto) como una función de un amplio intervalo de adiciones de volumen de reactivo de valoración.

Con el fin de establecer la proporción volumétrica de caudales de las bombas A y B (por ejemplo, como se muestra en la Figura 1), denominada en adelante como porcentaje de neutralización (v), el efecto de v en el pH y la concentración de cloruro, $[Cl^-]$ y por lo tanto en K_p , debe determinarse primero. El pH es una función de v , $pH = f(v)$, que puede calcularse a partir de una ecuación de Henderson-Hasselbach y verificarse por valoración del tampón de elución. La concentración de ion cloruro como una función de v , $[Cl^-] = f(v)$, podría también calcularse en cualquier proporción de tampones. Las funciones de pH y $[Cl^-]$ resultantes de v pueden estar sustituidas en una función derivada empíricamente $K_p = f(pH, [Cl^-])$ y representarse gráficamente como se muestra en la Figura 6A. El objetivo de la operación v se elige en base a la función deseada K_p . Esta forma de $K_p = f(v)$ refleja el estado actual de la técnica. Por lo tanto, la combinación de parámetros que da lugar a esta forma de la función se conoce como un modo de control de operación.

En el ejemplo mostrado en la Figura 6A, el tampón de elución proA de pH bajo contiene NaCl, mientras que el tampón de neutralización no contiene nada de sal. Por lo tanto, el pH se eleva mientras $[Cl^-]$ cae con el incremento de v , lo que resulta en incrementar de manera constante K_p . Este modo de funcionamiento presenta un reto, ya que llega a ser crítico para mantener una relación de neutralización precisa y constante con el fin de asegurar el rendimiento de AEX deseado. Esta precisión puede ser difícil de lograr en la escala de fabricación, ya que el rendimiento de la bomba puede ser variable. Se encontró que mediante la incorporación de sal en el tampón de neutralización, alguien podría

cambiar significativamente la forma de la función Kp, como se muestra en la Figura 6B. Este comportamiento de la función Kp se debe al aumento simultáneo de pH y [Cl⁻] con el volumen de reactivo de valoración añadido. El pH más alto hace la unión a AEX más fuerte, mientras que una mayor [Cl⁻] tiene el efecto contrario. La suma de estos dos efectos produce una región de resistencia de unión constante en un amplio intervalo de la adición de reactivo de valoración.

5 Una combinación de la invención de parámetros que da lugar a esta forma de función Kp = f(v) se proporciona por la presente divulgación y se refiere como modo Robusto de funcionamiento. Los ejemplos mostrados en las figuras 6A y 6B demuestran que la adición de sal al reactivo de valoración haría al proceso de tándem más robusto con respecto a la exactitud de la mezcla de tampón en línea después de la columna proA.

10 Otra forma de visualizar un funcionamiento en tándem robusto se representa en la Figura 7. El modelo empírico Kp = f(pH, [Cl⁻]) obtenido de un experimento de unión de lote de alto rendimiento de lotes permite a alguien trazar una línea de iso-Kp, que muestra la relación entre el pH y [Cl⁻] produciendo una fuerza constante de unión. A partir del modelo de valoración discutido anteriormente (figuras 6A y 6B), el pH del efluente de proA neutralizado podría ser trazado como función de [Cl⁻]. Según el estado actual de la técnica, el pH se disminuirá con el aumento de [Cl⁻] como se muestra en la figura 7A. Sin embargo, cuando el tampón de elución de proA ácido se valora con un tampón de neutralización básico que también contiene NaCl, la concentración de iones cloruro en la mezcla aumenta linealmente con v. Por lo tanto, el pH del tampón de elución valorada representada como una función del total de [Cl⁻] en la Figura 7B tendrá la misma forma que la función de pH en la Figura 6B. Una porción de la función de pH = f([Cl⁻]) se solapará con una curva de iso-Kp. En esta región de solapamiento, una pequeña variación en el volumen de reactivo de % de valoración causará un cambio a lo largo de la línea de iso-Kp, por lo que no afectará la fuerza de unión a la resina de AEX.

20 Una clara diferencia entre los modos de funcionamiento sin sales en el tampón de neutralización (Figura 6A y Figura 7A, modo Control) y con sal (Figura 6B y Figura 7B, modo Robusto) se demostró con un MAb terapéutico. La purificación de esta molécula por cromatografía por lotes dio como resultado niveles altos de HMW en la reserva de proA. Estas HMW se eliminan de manera efectiva por la etapa de partición débil TMAE-cromatografía de intercambio aniónico. Por lo tanto, se usó la eliminación de HMW como un marcador de pureza en un funcionamiento en tándem.

25 La combinación de tampones utilizados en las simulaciones y experimentos se resumen en la Tabla 1. Las composiciones de tampón se eligieron de una manera tal como para producir la misma Kp = 1,25 para ambos modos de funcionamiento en v = 11,5 %. Las composiciones de tampón de elución de control son muy similares a las empleadas en una campaña de fabricación clínica, proporcionadas en la Tabla 3.

Tabla 1. Composiciones tampón para demostración de funcionamiento en tándem robusto.

	Tampón de elución	Tampón de neutralización
Modo Control	Gly 49 mM, NaCl 56 mM, pH 2,8	Tris 2 M pH 9,5
Modo Robusto	Gly 50 mM, NaCl 17 mM, Tris 20 mM pH 3,7	Tris 0,2 M, NaCl 0,25 M NaCl pH 9,5

30 Las simulaciones de los dos modos de operación mostrados en la Figura 6, se verificaron experimentalmente mediante la realización del tándem en el punto central (v = 11,5 %), en el punto sub-valorado (v = 6,5 %) y en el punto sobre-valorado (v = 16,5 %)-un total de 6 carreras.

35 Una superposición de funciones Kp simuladas para los modos Control y Robusto se muestra en la Figura 8. Por definición, se espera que ambos modos se lleven a cabo de manera similar en términos de pureza del producto y recuperación en el punto central. Sin embargo, sus funciones Kp divergen de manera espectacular en los dos extremos de una desviación arbitrariamente elegida en v. Por ejemplo, en v = 6,5 % (equivalente a una disminución del 46,5 % en la tasa de flujo de la bomba B), el Kp resultante disminuye en solo el 28 % en el modo Robusto, en comparación con una disminución del 91 % en el modo Control. Del mismo modo, en v = 16,5 % (equivalente a un incremento del 52 % en el caudal de la bomba B), Kp se reduce en solo el 15 % en el modo Robusto, pero se eleva en un 197 % en el modo Control. Por lo tanto, el modelo predice cambios relativamente pequeños en la calidad del producto y la recuperación después de un cambio absoluto de ± 5 % en proporción de neutralización en el modo Robusto. Sin embargo, en el modo Control, sub-valoración en un 5 %, probablemente causaría un gran avance de HMW y HCP, mientras que la sobre-valoración en un 5 % probablemente resultaría en una pérdida de recuperación del producto.

45 **Ejemplo 6. Funcionamiento de una etapa tándem proA-AEX en un intervalo de proporciones de neutralización (V) y en los parámetros que da como resultado un cambio relativo en Kp (k) por debajo del 100 % cuando v se varió del 50 % al 150 % del objetivo**

50 En este ejemplo, las etapas de tándem proA-AEX se llevaron a cabo en un intervalo de proporciones de neutralización (V) y a tal combinación de parámetros que dio como resultado el cambio relativo en Kp (k) por debajo del 100 % cuando v se varió del 50 % al 150 % del objetivo. De forma más precisa, las condiciones dieron como resultado k < 20 %, en el intervalo del 90 % al 110 % de la v objetivo.

Los parámetros de funcionamiento son los siguientes: pH, concentración de sal y pKa de los tampones de elución y neutralización. Diversas realizaciones de los procedimientos descritos en este documento establecen que un proceso sólido debería funcionar a una v objetivo dentro de la ventana de robustez. En algunas realizaciones, un procedimiento funciona en el centro de la ventana de robustez.

- 5 Con el fin de definir la ventana de funcionamiento robusto que es independiente de los valores de K_p y v , alguien puede emplear una función, $k = \text{ABS} [K_p (v + \Delta v) - K_p (v - \Delta v)] / K_p(v)$, %, que mide un cambio en % absoluto en K_p dentro de un intervalo de operación dado ($v \pm \Delta v$).

or ejemplo, para las enfermedades que se describen en el Ejemplo 5, si Δv se fija al 10%, la función de k se convierte en:

10
$$k_{20} = \text{ABS}[K_p(0,9v) - K_p(1,1v)] / K_p(v), \%$$

%,

que se representan en la Figura 9. La ventana de funcionamiento Robusto mostrada en este gráfico abarca el intervalo de v , donde k_{20} es < 20 %. El punto central del modo robusto de funcionamiento a $v = 11,5$ % corresponde a $k = 0$, haciéndolo el punto más preferible para funcionar. Por el contrario, el punto central del modo de control proporciona $k = 61$ %. Esto significa que al cambiar de una condición sub-valorada (al 10 %) a una condición sobre-valorada (al 10 %), el K_p de la carga de TMAE cambiará en un 61 % en el modo Control, mientras que permanece constante en un modo Robusto. Se prevé que el funcionamiento de un procedimiento en tándem fuera de la ventana de funcionamiento robusto limitará significativamente la desviación permitida de la proporción de neutralización, por lo tanto el procedimiento se hace más propenso al fracaso.

- 20 Para cualquier receta dada para un funcionamiento en tándem, incluso si la función K_p no se conoce, la práctica de un modo robusto como se trata en el Ejemplo 5 se podría determinar experimentalmente. Por ejemplo, tanto K_p como k podrían medirse en una serie de experimentos de unión de tres lotes, donde V se fija al 90 %, 100 % y 110 % del objetivo.

25 Una configuración experimental se basó en un sistema en tándem de dos columnas para la purificación de un anticuerpo anti-IL-13, de acuerdo con la Figura 1. Se componía de 1,1 cm x 23 cm de columna proA MabSelect, seguido de uno de 10 cm ² 0,2 μ m unidad de filtro Sterivex 10, seguido por una columna de 1,6 cm x 14 cm AEX TMAE. El medio acondicionado se flocula con fosfato de calcio y la almohadilla de filtrado con el fin de minimizar la precipitación post-neutralización. Neutralización pico de proA en línea se llevó a cabo mediante la programación de un sistema AKTA FPLC para entregar una cierta proporción de flujo de la bomba B en el intervalo de 6,5 %-16,5 % del flujo total. La unidad VRF se evitó en este experimento. Las fracciones fueron tomadas después de la TMAE para mediciones de pH y de concentración fuera de línea. HMW en las fracciones se evaluaron por HPLC de exclusión por tamaño. ELISA de HCP y ELISA de proA filtrada se llevaron a cabo en las reservas de las fracciones.

35 Una porción de los cromatogramas de procedimiento que muestra la región de pico de elución se muestra en la Figura 10. El orden de avance de proteínas fue el esperado dentro de cada grupo representando los modos de neutralización Control y Robusto. El cambio significativo en el tiempo de retención del pico entre los dos grupos se debió a diferentes pH de tampones de elución proA. El modo de control emplea un pH más bajo del tampón de elución que el modo robusto (véase la Tabla 1), resultando en la elución de la columna anterior proA y avance anterior de producto a través de la columna de TMAE. Las mediciones fuera de línea en fracciones post-TMAE se muestran en las figuras 11A-11F. Como se predijo, el modo Robusto de funcionamiento no se vio afectado significativamente por v . Las Figuras 11B, 11D y 11F parecen tener perfiles de pH, concentración y HMW muy similares. Por el contrario, el modo de control exhibió tendencias definidas en los perfiles de avance HMW y la elución de productos como los v cambia del 6,5% al 11,5% a 16,5% (Figuras 11A, 11C y 11E). Sub-valoración ($v = 6,5\%$, la Figura 11 A) resultó en niveles de pH que son demasiado bajos para la unión eficaz de producto y las impurezas a la resina TMAE. Como consecuencia, el pico de producto era muy agudo y HMW avanzaron pronto en la elución. Sobre-valoración ($v = 16,5\%$, Figura 11 E) condujo a un resultado opuesto: ningún avance HMW, pero una muy amplia elución y recuperación del producto baja.

Un avance HMW anteriormente en la prueba de control en el punto central ($v = 11,5$ %, Figura 11C) puede ser debido a un efecto de no equilibrio, tal como la oclusión de los poros, causada por la incapacidad de la resina TMAE para hacer frente a una banda altamente concentrada de proteína que eluye de la columna de la proA a pH = 2,8.

- 50 Los resultados de la pureza de ejecuciones en la Figura 11 se resumen en la Tabla 2. Como se predijo, la ejecución Control sub-valorada dio como resultado los niveles más altos de impurezas. Sin embargo, debido a la limitada sensibilidad de los ensayos, no fue posible distinguir las otras reservas.

Tabla 2. Efecto de la v en la pureza de la reserva en tándem en los modos Robusto y Control.

Ejecución (como en la Figura 11)	v , %	K_p predicha	HMW en la reserva de 3 CV, %	HCP, ppm	ProA de filtrado, ppm

Ejecución (como en la Figura 11)	v, %	Kp predicha	HMW en la reserva de 3 CV, %	HCP, ppm	ProA de filtrado, ppm
A (Control, sub-valorado)	6,5	0,10	3,26	30	4,3
B (Robusto, sub-valorado)	6,5	0,90	0,14	BLOQ	BLOQ
C (Control, punto medio)	11,5	1,25	0,11	BLOQ	0,11
D (robusto, punto medio)	11,5	1,25	0,04	BLOQ	0,07
E (Control, sobre-valorado)	16,5	3,70	0,14	BLOQ	0,034
F (Robusto, sobre-valorado)	16,5	1,06	0,29	BLOQ	BLOQ

Los resultados experimentales confirmaron la predicción del modelo de robustez. La realización en tándem mostró ser más robusta cuando se añadió sal al tampón de neutralización.

Ejemplo 7. Elución de la proteína A

5 Se descubrió que la elución de la proteína A con una solución que contiene un tampón que tiene una pKa cerca de la condición de elución (usualmente hecha funcionar en o cerca de las condiciones ácidas) y también un tampón que tiene una pKa cerca de la operación de la etapa de AEX subsiguiente (usualmente hecha funcionar en o cerca de condiciones neutras o básicas), evitó desviaciones de pH durante la neutralización de la corriente del procedimiento y eluyó a partir de la proteína A.

10 En una operación en tándem con una proporción de neutralización constante, el borde delantero de la elución de proA a veces tiene un pH mayor que el objetivo. El pH elevado está causado por la pérdida de capacidad de tamponamiento por el tampón de elución a medida que pasa a través de la columna de la carga proA, que contiene ligandos proA valorables proA y producto unido. Tras la adición de tampón de neutralización de pH alto para el tampón de elución de ácido agotado, pH se eleva a casi el nivel del tampón de neutralización y se mantiene alta hasta que todos los residuos en la columna de la proA han sido valorados y el ácido que contiene tampón de elución aparece en el mezclador.

15 Aunque por lo general la desviación de pH se produce justo antes de la parte delantera de proteínas viene a través de la AEX y no afecta a la calidad o la recuperación de la reserva en tándem, se observa a veces pH elevado durante la recogida de pico. El pH elevado significa que AEX se carga en condiciones de unión alta antes de que el tampón de elución neutralizada del pH objetivo pase a través de la columna. En algunos casos, esta desviación de pH podría causar la unión irreversible de productos o impurezas de HMW a la superficie de las perlas de resina, dando como resultado la oclusión de poros y una pérdida prematura de capacidad de unión a AEX.

20

Con el fin de mitigar la oscilación de pH, se añadió Tris-HCl 20 mM para el tampón de elución en el modo Robusto y el pH se ajustó al objetivo pH = 3,7, como se indica en la Tabla 1. El Tris acidificado quedó protonado a su paso por la columna de la proA y proporcionó resistencia al exceso de Tris básico durante la neutralización.

25 La comparación de las mediciones de pH fuera de línea en fracciones en tándem, como se muestra en la Figura 11 demuestra el efecto de Tris-HCl en la extensión de la oscilación de pH. Ejecuciones de neutralización Robustas muestran una tendencia de pH más superficial que las ejecuciones Control. Por ejemplo, en las ejecuciones de punto central (V = 11,5 %, Figura 11, C, D), el pH disminuyó en solo 0,1 unidades durante la elución pico en el modo robusto, disminuyendo mientras en 0,3 unidades en el modo Control. En todas las ejecuciones Robustas el cambio de pH está en gran parte sobreestimado cuando las concentraciones de proteínas alcanzan su pico, mientras que en las ejecuciones Control el pH sigue siendo muy superior que el objetivo.

30

Ejemplo 8. Funcionamiento de una cromatografía proA por lotes seguida de una cromatografía de AEX por lotes (no en tándem)

Se realizó cromatografía de proA por lotes seguida de cromatografía de AEX por lotes a las condiciones descritas en los Ejemplos 5, 6 y 7.

35 En una cromatografía por lotes tradicional, el pH y la conductividad de una reserva proA neutralizada son parámetros críticos que afectan el rendimiento de la etapa de AEX y por lo tanto la calidad del producto. Después de la etapa de inactivación de virus de pH bajo, la reserva pico proA se neutraliza a un pH determinado con el fin de ser adecuada para la etapa de AEX de partición débil. La neutralización por lotes se realiza generalmente mediante la adición gradual del 1-2 % en volumen de reactivo de valoración, que contiene agente tampón concentrado con una pKa cerca del pH de trabajo de ejecución de AEX. La valoración continúa hasta que el pH ha alcanzado el valor deseado. La conductividad se controla y se registra, pero no podría ajustarse independientemente del pH. Idealmente, tanto el pH como la conductividad alcanzan los valores objetivo simultáneamente. Sin embargo, debido a la mezcla incompleta y el efecto de la temperatura sobre las mediciones de pH, la lectura de pH al final de la valoración puede ser inexacta,

40

resultando en demasiado, o no suficiente, del reactivo de valoración añadiéndose a la reserva.

En una situación de sobre-valoración accidental, el pH real de la reserva neutralizada superará el objetivo en un grado más alto que la conductividad, ya que el agente tampón tiene solamente un efecto moderado sobre la conductividad. El pH elevado producirá un aumento general en K_p y una disminución correspondiente en la recuperación de producto durante la etapa de AEX. Por una razón similar, la sub-valoración dará como resultado un pH inferior al objetivo, que no será compensado por una disminución de la conductividad adecuada. En este caso, la calidad del producto se verá afectada por la unión débil de impurezas.

Además, el requisito de GMP para satisfacer dos parámetros críticos (pH y conductividad) de forma simultánea y sin la capacidad de controlarlos de forma independiente, puede incrementar el riesgo de rechazo de lotes. Por lo tanto, sería deseable tener un procedimiento de neutralización con un mecanismo incorporado para compensar una desviación en un parámetro afectando automáticamente al otro en la dirección apropiada. Por ejemplo, si el exceso de valoración se produce con un aumento concomitante de $[Cl^-]$ (y conductividad), no dará lugar a ningún cambio general en K_p . Tal mecanismo eliminaría la necesidad de tener dos parámetros críticos, dado que el pH estaría ligado a la conductividad, siempre que las memorias intermedias se formulen con precisión. En cambio, el registro de lote puede especificar solo la fracción volumétrica del reactivo de valoración, v , que se añade a la reserva.

Se descubrió que la incorporación de sal concentrada en el reactivo de valoración lograría el efecto descrito anteriormente. Los mismos modelos matemáticos y físicos discutidos en los Ejemplos 5 y 6 para describir la neutralización continua se aplican aquí para un procedimiento de cromatografía por lotes. Un modo Control, sin sal en el tampón de neutralización y condiciones de elución proA agresivas se compara con un modo Robusto, donde el tampón de neutralización contiene NaCl concentrado y donde la elución de proA se produce a pH relativamente suave. Las composiciones tampón ejemplares se resumen en la tabla 3. Como en el modelo en tándem, las condiciones se diseñaron para producir la misma $K_p = 1,25$ para ambos modos de funcionamiento a la misma relación de neutralización $v = 1,15\%$.

Los tampones de modo Control son muy similares a los empleados en una campaña de fabricación, también enumerados en la Tabla 3. El registro del lote especifica la valoración de la reserva proA a pH 7,8, lo que correspondería a $K_p = 0,81$ en $v = 1,40\%$.

Ejemplos de pH, $[Cl^-]$ y K_p en función de v para un procedimiento por lotes que se muestran en la Figura 13 parecen ser muy similares a los de un procedimiento en tándem en la Figura 6. También se puede observar que los tampones de neutralización son exactamente 10x las concentraciones empleadas en el funcionamiento en tándem, mientras que v es exactamente 0,1x que en el funcionamiento en tándem. Este inesperado resultado demuestra la escalabilidad de los procedimientos de la invención proporcionados en el presente documento: lo que sugiere que el modelo para determinar las condiciones de neutralización Robustas es aplicable en un amplio intervalo de v .

La Figura 14A muestra diferentes efectos que una sobre-valoración y una sub-valoración tendrían en $K_p = f(v)$ en los modos Robusto y Control de funcionamiento. Por ejemplo, si la valoración se detuvo en $v = 0,55\%$, en lugar del objetivo $v = 1,15\%$, K_p en el modo Robusto sería 1,09, mientras que en el modo Control se reduciría a 0,08, probablemente como resultado de un fallo de la etapa de TMAE.

Tabla 3. Composiciones tampón para operación por lotes de realización de modelos

	Tampón de elución	Tampón de neutralización
Modo de control	Gly 50 mM, NaCl 41,4 mM, pH 2,8	Tris 2 M pH 9,5
Modo robusto	Gly 50 mM, NaCl 6,8 mM, Tris 20 mM pH 3,55	2 M Tris, 2,5 M NaCl pH 9,5
Utilizado en campaña	Glicina 50 mM, NaCl 37 mM, pH 2,9	Tris 2 M pH 8,5

Figura 14B define la ventana de funcionamiento fuerte reivindicada, donde la función de cambio de K_p relativa, $k = ABS [K_p(1,1v) - K_p(0,9v)] / K_p(v)$, % es $< 20\%$. La comparación del comportamiento k en los modos Robusto y Control demuestra que, si bien sería seguro establecer un objetivo de valoración en cualquier lugar entre el 0,75% y el 1,55% (pero preferiblemente, al 1,15%) del reactivo de valoración en el modo Robusto, el modo Control produciría un cambio significativo en k en el intervalo de $\pm 10\%$ de desviación en v .

Ejemplo 9. Purificación en tándem a diferentes condiciones de unión

Un producto inmunofarmacéutico modular pequeño se purificó por el AEX por lotes control o por proA-AEX en tándem en diversas combinaciones de condiciones. Las Figuras 15A-15C muestran una comparación de estos esquemas de purificación utilizando neutralización proA programada para proporcionar condiciones de unión débiles ($K_p = 1,5$). Un procedimiento en tándem utiliza elución agresiva (pH 3,5) sin Tris en el tampón de elución. El segundo procedimiento en tándem utiliza elución suave (pH 3,75) y Tris-HCl en el tampón de elución. La adición de Tris para el tampón de elución proA eliminó el aumento de pH visto después de la valoración. Eluir la proA con un tampón de pH más alto mitigó la limitación cinética supuesta de la AEX para unir especie HMW1. La calidad del producto era excelente.

5 En una segunda serie de experimentos, un producto inmunofarmacéutico modular pequeño también se purificó AEX por lotes control o por proA-AEX en tándem en diversas combinaciones de condiciones. Las Figuras 16A-16C muestran una comparación de estos esquemas de purificación utilizando una neutralización proA programada para suministrar condiciones de unión más fuertes ($K_p = 3,0$) que en la primera serie de experimentos. Un procedimiento en tándem utiliza elución agresiva sin Tris en el tampón de elución. El segundo procedimiento en tándem utiliza elución suave y Tris-HCl en el tampón de elución. Las condiciones de unión más fuertes reducen el nivel de HMW1 en el proceso de elución agresiva (Figura 16B). La recuperación estuvo por encima del 90 % en todos los casos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de recuperación de un producto de proteína purificada a partir de un fluido de carga, comprendiendo el procedimiento:
- 5 a) exponer un fluido de carga que comprende un producto proteico a una columna que comprende una primera resina en condiciones en las que el producto se une a la resina;
- b) recuperar fluido que comprende el producto de la primera resina para producir un primer eluato;
- 10 c) valorar el primer eluato con un reactivo de valoración a medida que pasa a la segunda resina, en el que el reactivo de valoración altera una o más condiciones del primer eluato tal cuando la relación volumétrica del eluato al reactivo de valoración varía hasta en un 40 %, el cambio en el coeficiente de reparto del producto de la segunda resina es menor del 10 %;
- d) exponer el eluato valorado a una columna que comprende la segunda resina en condiciones en las que el producto se une a la segunda resina, en el que la columna que comprende la primera resina está dispuesta en tándem con la columna que comprende la segunda resina; y
- 15 e) recuperar fluido que comprende el producto de la segunda resina para producir un segundo eluato, recuperando de esta manera un producto de proteína purificada a partir de un fluido de carga.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer eluato se valora con el reactivo de valoración en una relación volumétrica de entre aproximadamente 95:5 a 80:20.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que una primera bomba suministra el fluido de carga a la primera resina, una segunda bomba suministra el reactivo de valoración al primer eluato y en el que las bombas se operan a una proporción de caudales que varía en menos del 30 %.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el reactivo de valoración y el primer eluato se hacen pasar a través de un mezclador, antes de la exposición a la segunda resina.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende detectar el pH del eluato valorado, antes de la exposición a la segunda resina.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el eluato valorado se hace pasar a través de un filtro, antes de la exposición a la segunda resina.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los sólidos se eliminan del fluido de carga por precipitación.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el fluido de carga comprende medio de cultivo celular.
- 30 9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la proteína comprende una parte de unión a antígeno de un anticuerpo.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la primera resina une selectivamente inmunoglobulinas.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la segunda resina comprende una resina de intercambio iónico.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el reactivo de valoración altera una o más condiciones del primer eluato de tal manera que el producto en el eluato valorado se une a la segunda resina en un modo de partición débil.
- 35 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que las condiciones del eluato valorado y la resina son tales que el coeficiente de reparto del producto para la resina es 0,1-20.
14. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la resina de intercambio iónico es una resina de intercambio aniónico.
- 40 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el reactivo de valoración tiene un pH que está 0,5 unidades por encima de un pH en el que la resina de intercambio aniónico se une al producto en el eluato valorado en un modo de partición débil.
16. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el reactivo de valoración comprende una sal.
- 45 17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el reactivo de valoración aumenta la fuerza iónica del eluato de la primera resina de manera que el producto mantiene la unión a la segunda resina en un intervalo de adiciones de volumen de reactivo de valoración.
18. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la resina de intercambio iónico es una resina de intercambio

catiónico.

19. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende tratar el fluido de carga, el primer eluato, o el segundo eluato con uno o más tratamientos de reducción de virus.
- 5 20. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende tratar el fluido de carga, el primer eluato, o el segundo eluato con uno o más tratamientos de reducción de viscosidad.
21. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la segunda resina es una resina de intercambio aniónico y en el que el producto se recupera de la primera resina en un fluido que comprende un tampón que tiene una pKa que está cerca de condiciones en las que el producto se eluye de la resina y un tampón que tiene una pKa cerca de condiciones en las que el producto se une a la segunda resina en un modo de partición débil.
- 10 22. Un procedimiento de recuperación de un producto de proteína purificada a partir de un fluido de carga, comprendiendo el procedimiento:
- a) exponer un fluido de carga que comprende un producto de proteína a una columna que comprende una primera resina en condiciones en las que el producto se une a la resina, en el que la primera resina es una resina de proteína A;
- 15 b) eluir fluido que comprende el producto de la primera resina para producir un primer eluato, en el que el producto se eluye de la primera resina en un fluido de elución que comprende un tampón que tiene una pKa que está cerca de condiciones en las que el producto se eluye de la resina y un tampón que tiene una pKa cerca de condiciones en las que el producto se une a la segunda resina en un modo de partición débil;
- c) valorar el primer eluato con un reactivo de valoración a medida que pasa a la segunda resina;
- 20 d) exponer el eluato valorado a una columna que comprende la segunda resina en condiciones en las que el producto se une a la segunda resina, en el que la columna que comprende la primera resina está dispuesta en tándem con la columna que comprende la segunda resina; y
- e) recuperar fluido que comprende el producto de la segunda resina para producir un segundo eluato, recuperando de esta manera un producto de proteína purificada a partir de un fluido de carga.
- 25 23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que la segunda resina es una resina de intercambio aniónico, en el que el reactivo de valoración altera una o más condiciones del primer eluato de tal manera que el producto en el eluato valorado se une a la resina de intercambio aniónico en un modo de partición débil, en el que el reactivo de valoración altera una o más condiciones del primer eluato tal cuando la relación volumétrica del eluato al reactivo de valoración varía hasta el 40 %, el cambio en el coeficiente de reparto del producto para la segunda resina es menos del 10 % y en
- 30 el que el reactivo de valoración aumenta la fuerza iónica del eluato de la primera resina de tal manera que el producto **mantiene la unión a la segunda resina en un intervalo de adiciones de volumen de reactivo de valoración.**

FIG. 1

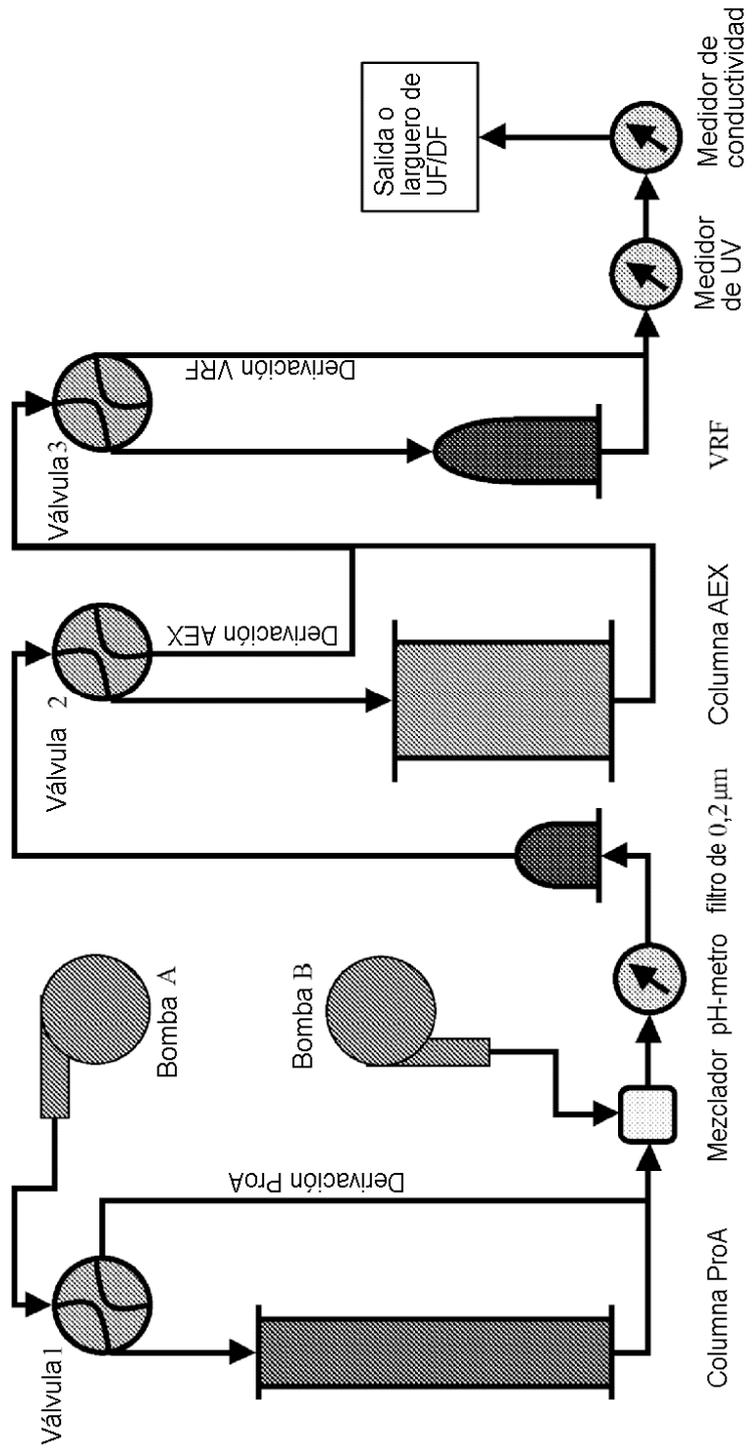


FIG. 2

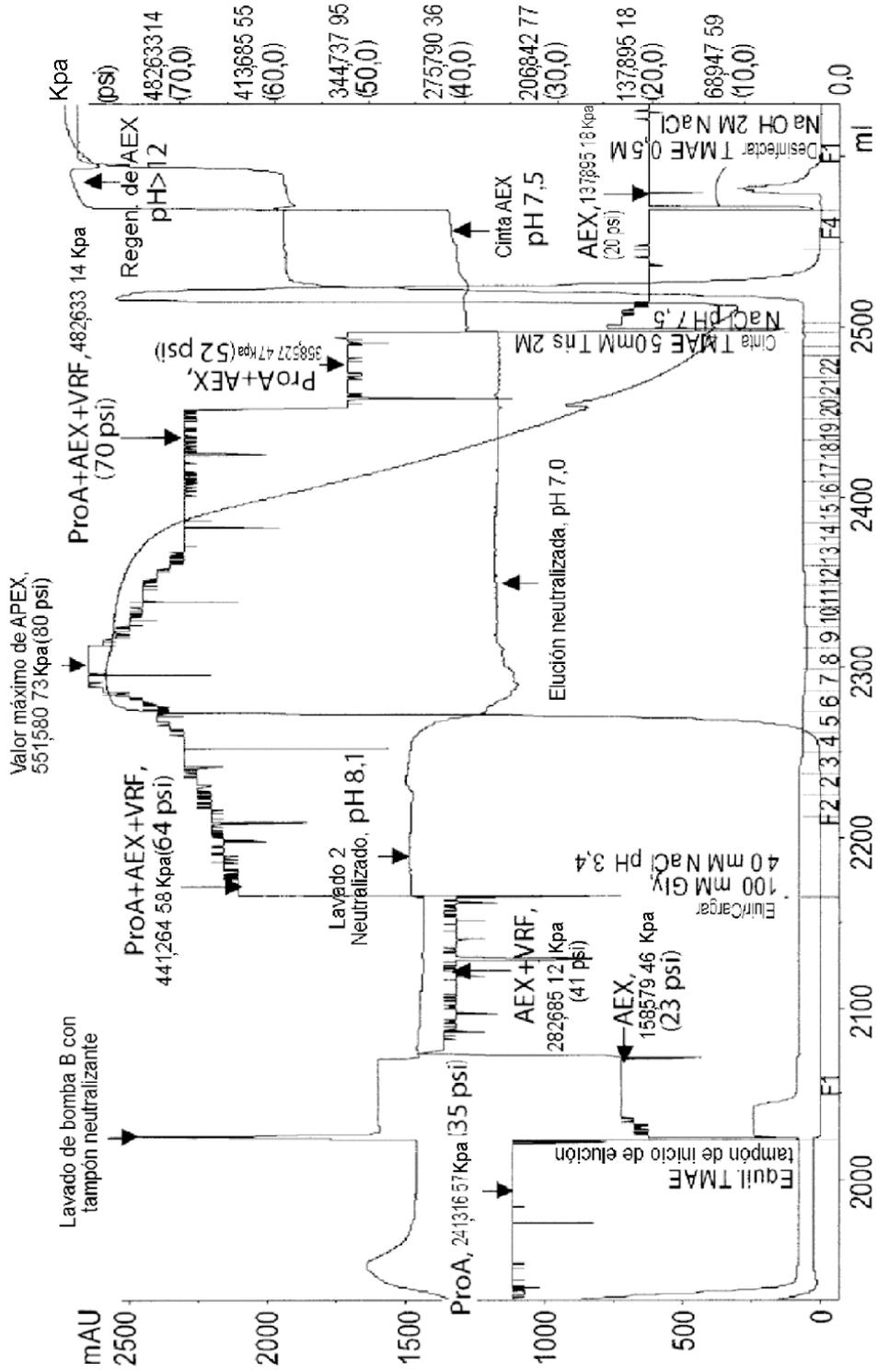


FIG. 3

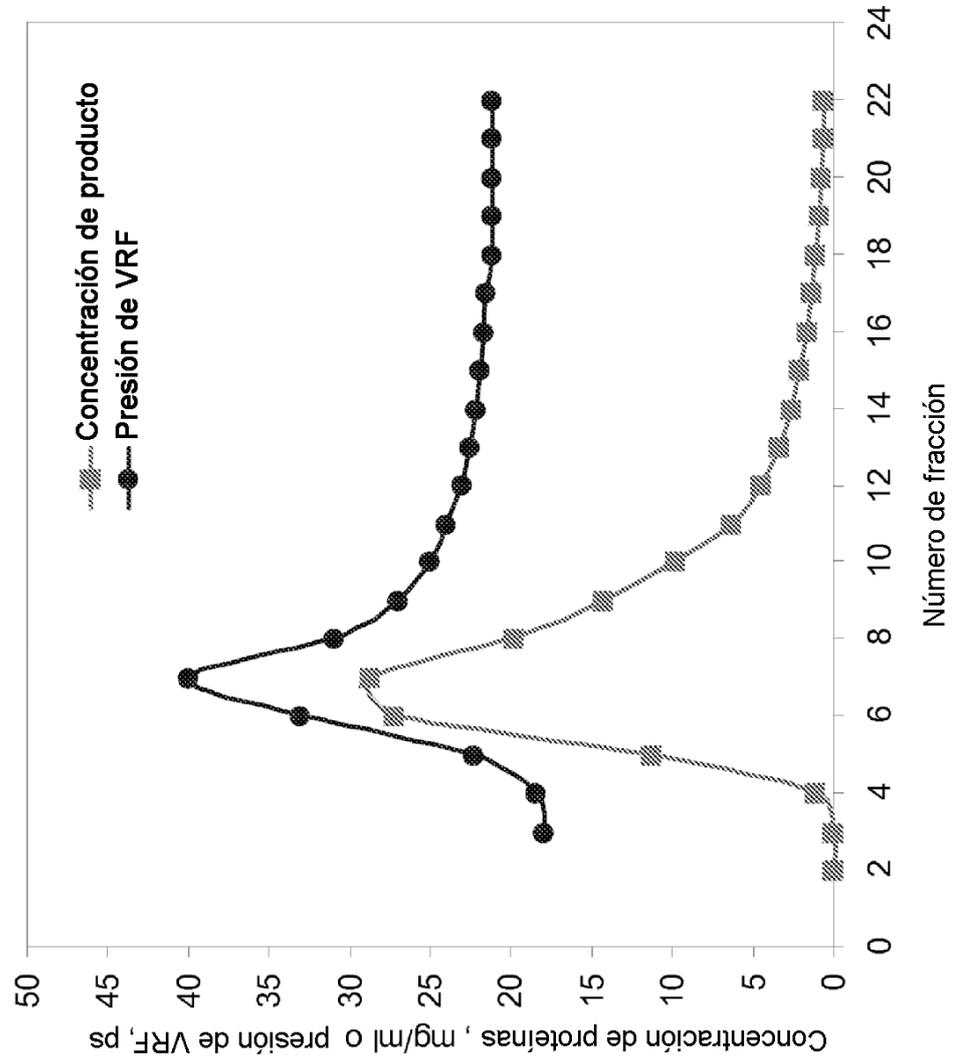


FIG. 4A

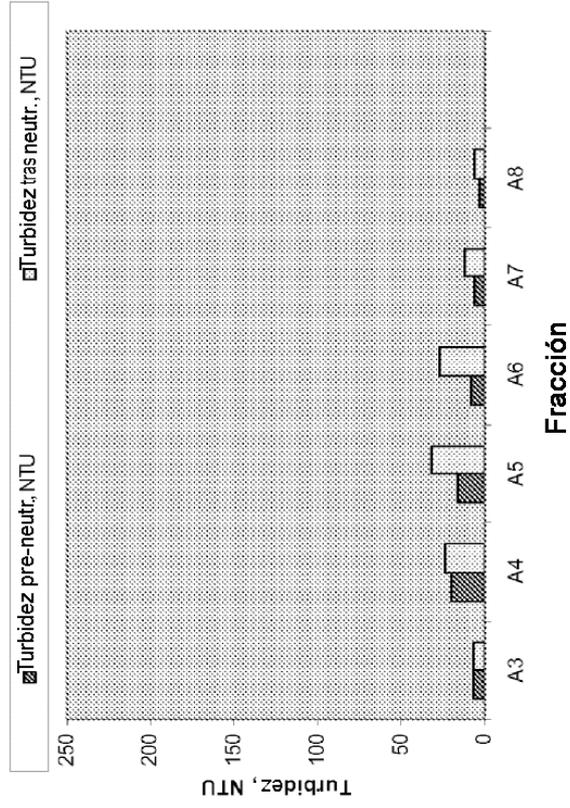


FIG. 4B

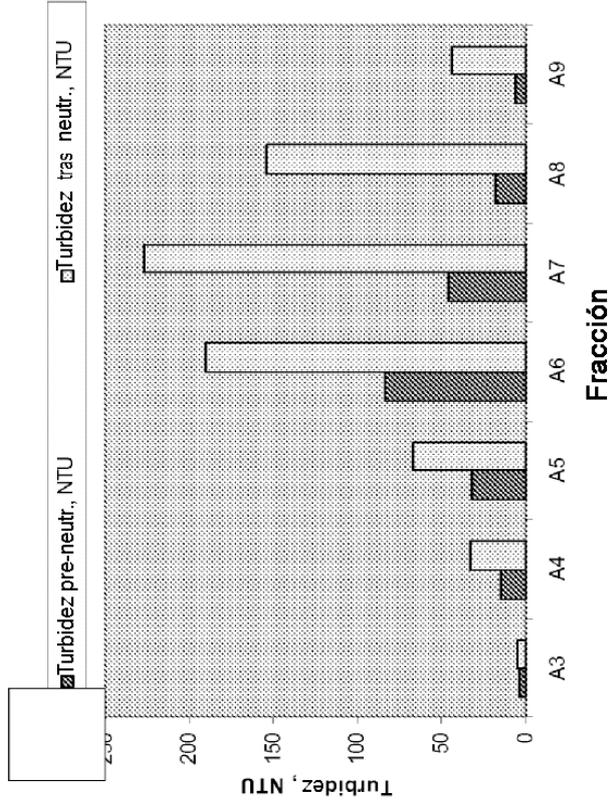


FIG. 5

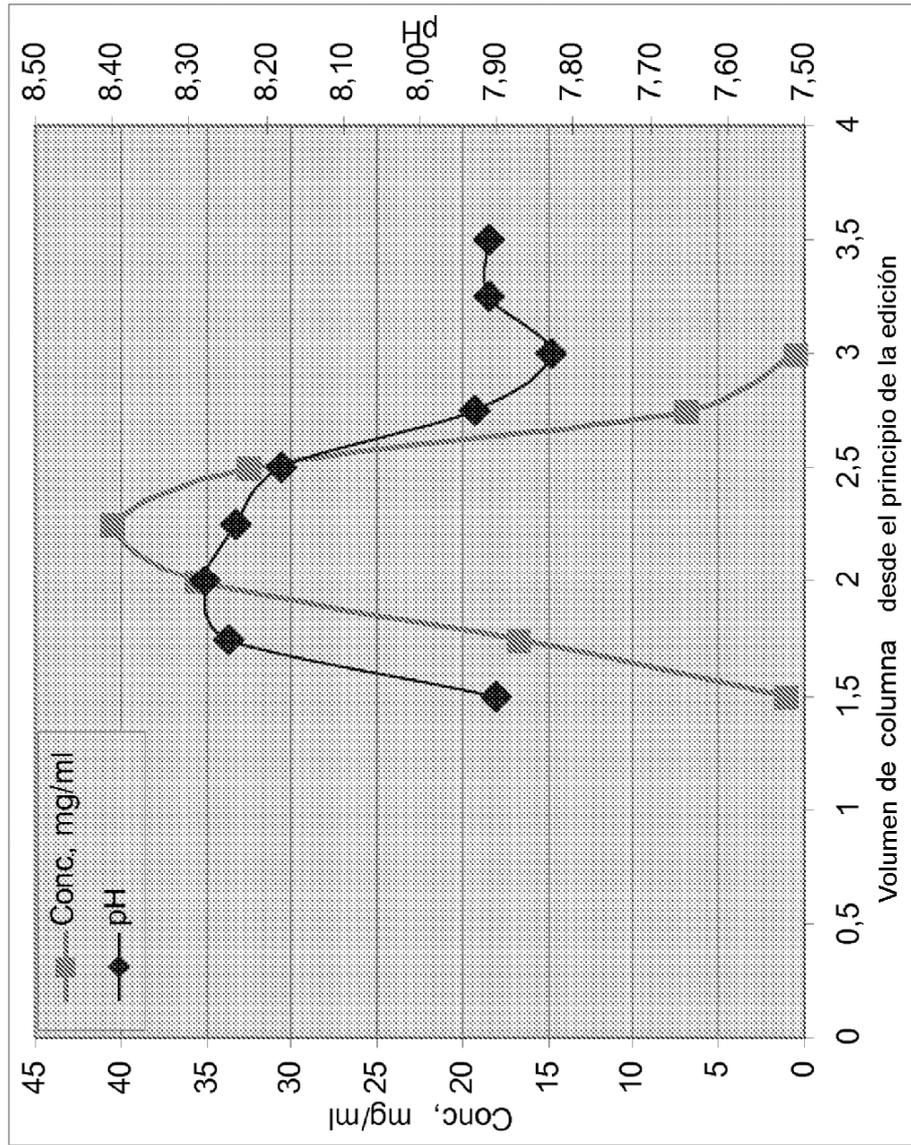


FIG. 6B

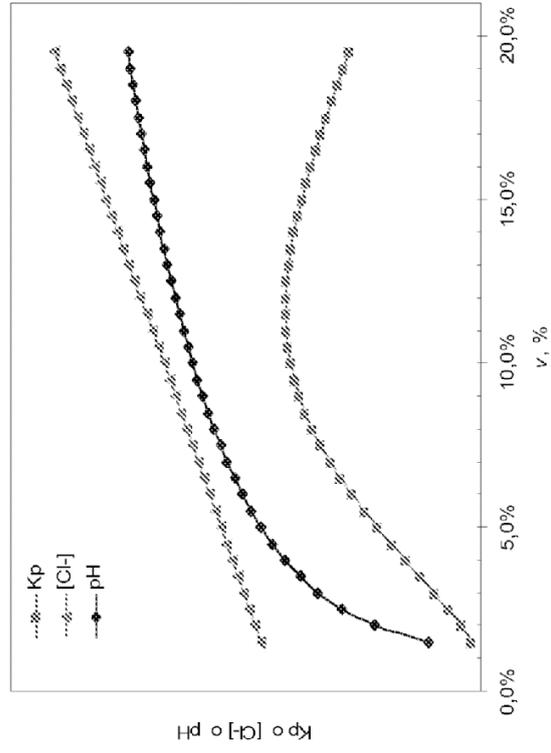


FIG. 6A

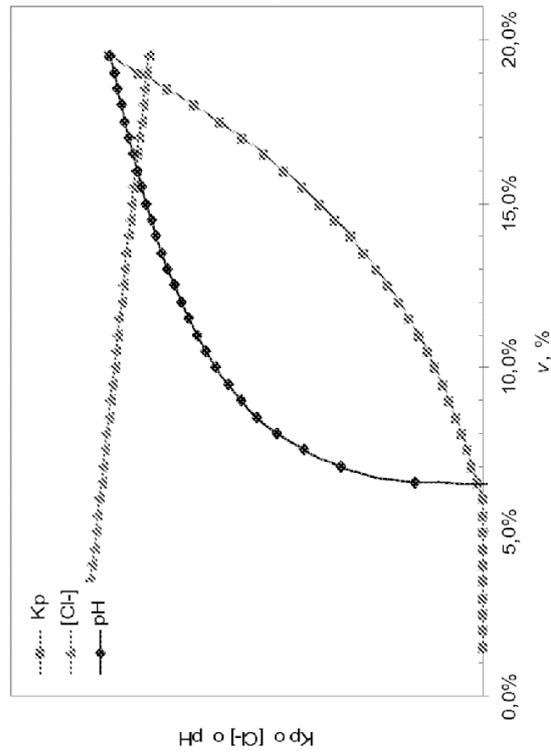


FIG. 7A

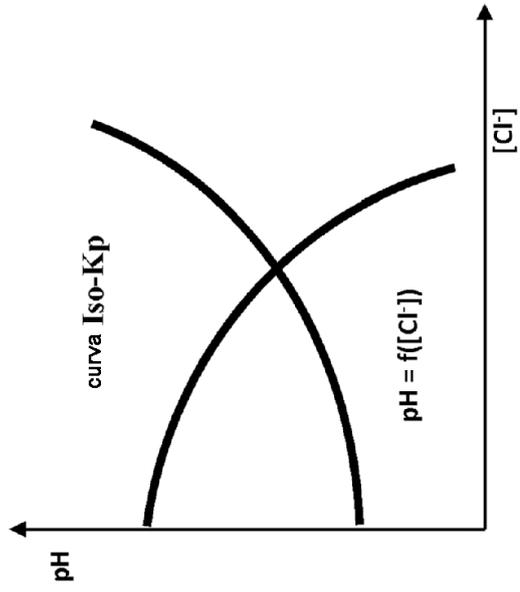


FIG. 7B

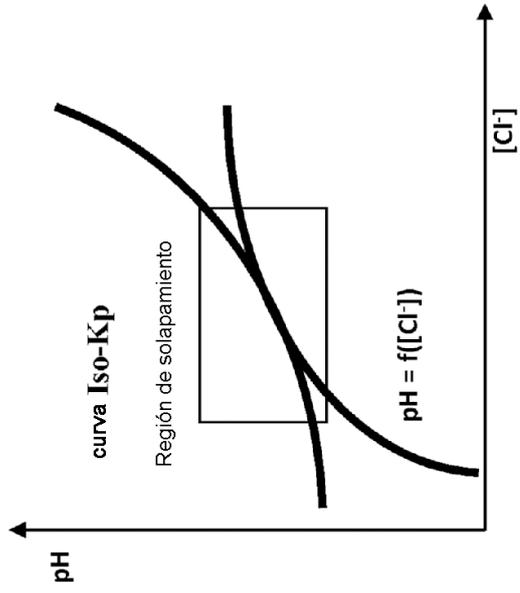


FIG. 8

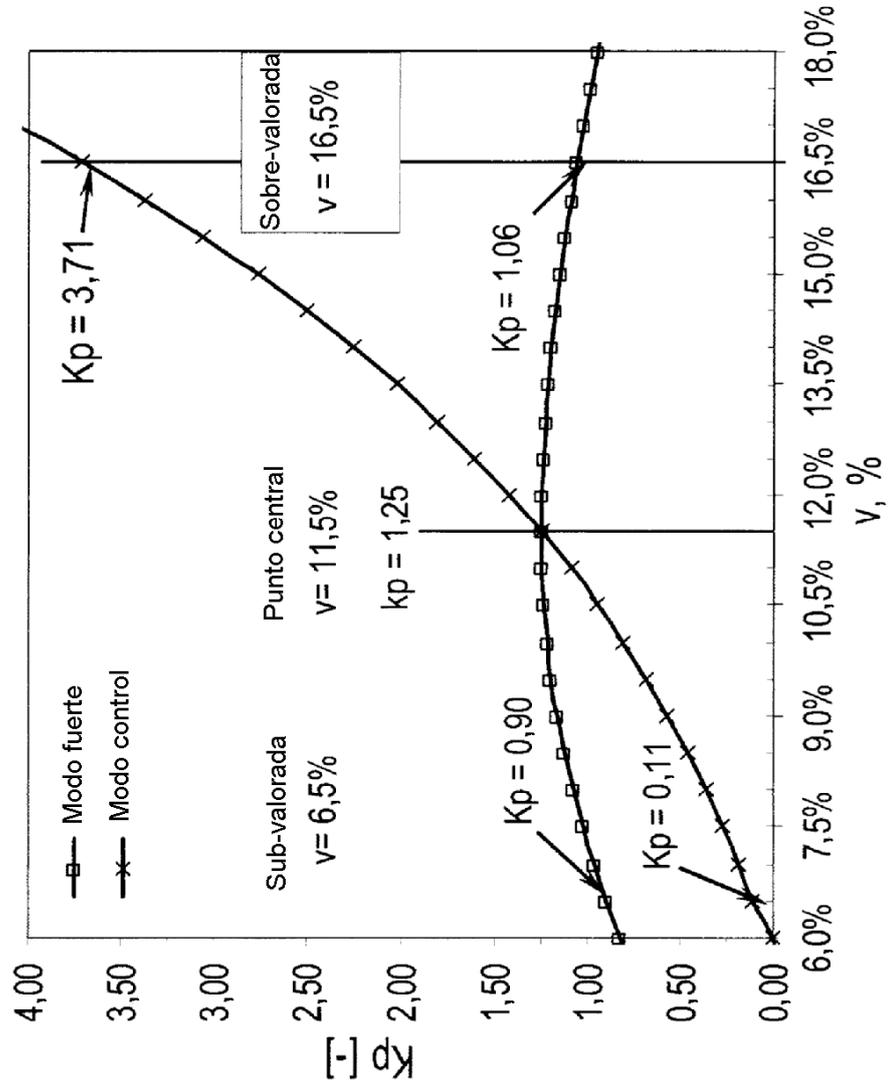


FIG. 9

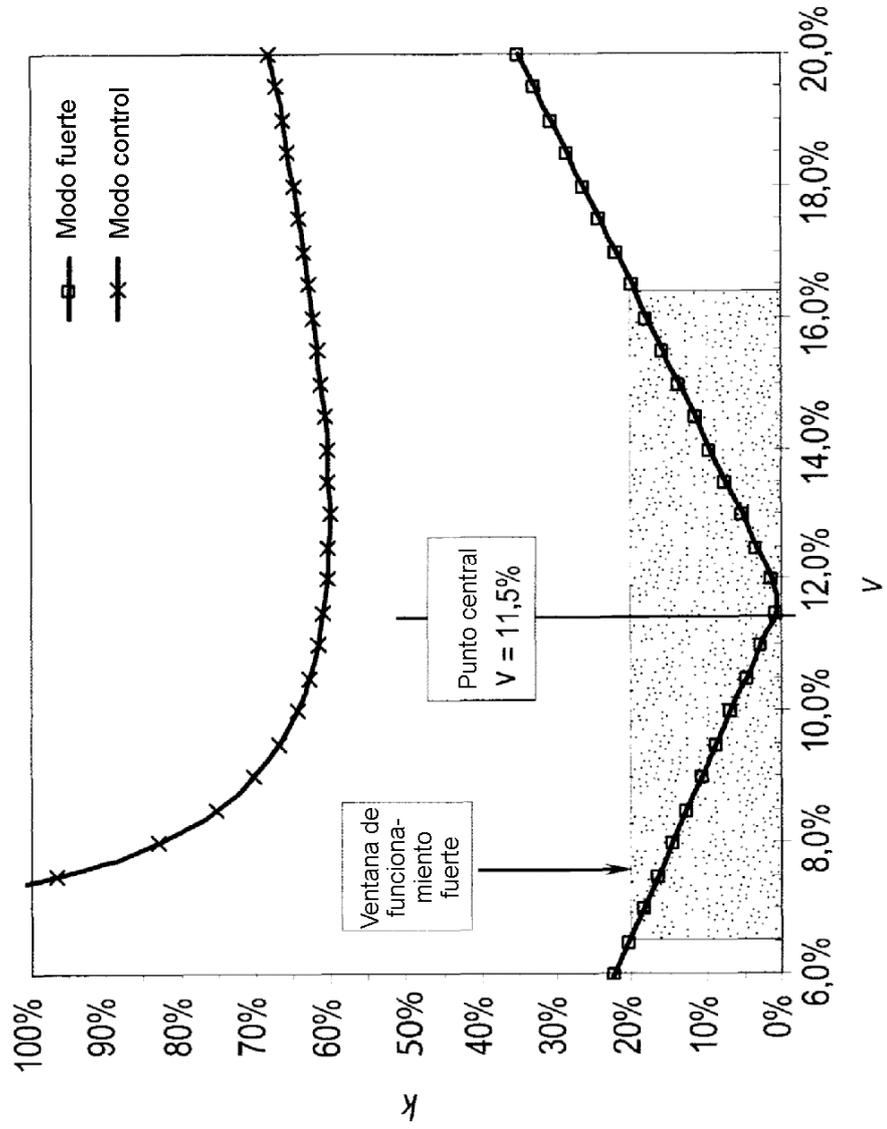


FIG. 10

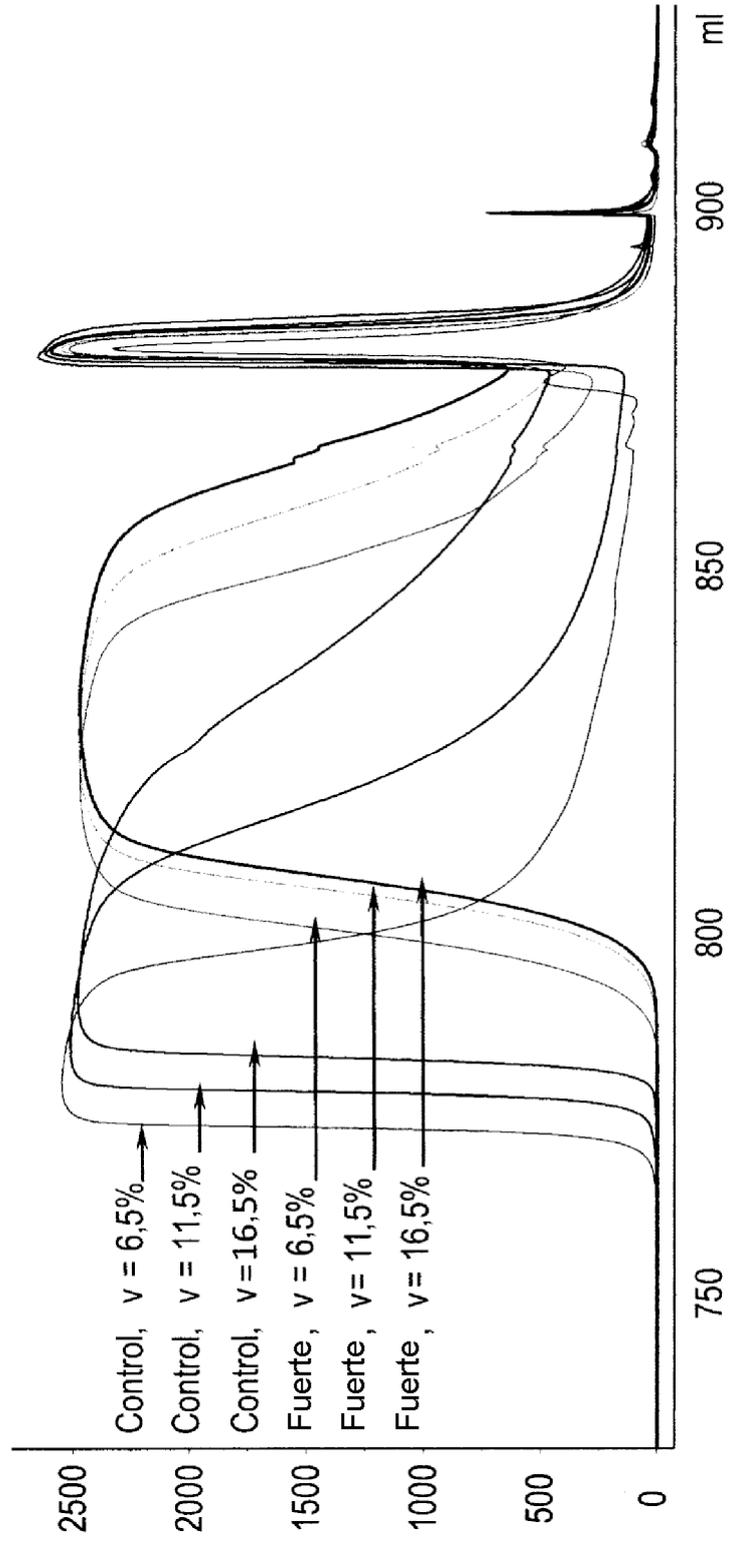


FIG. 11A

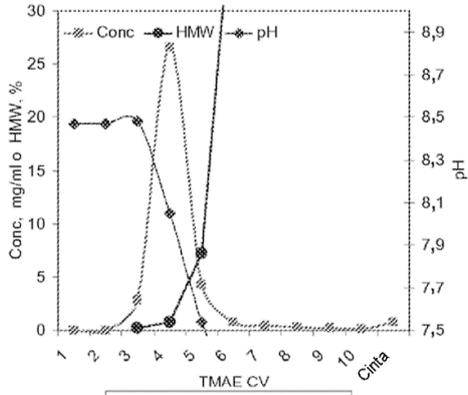


FIG. 11B

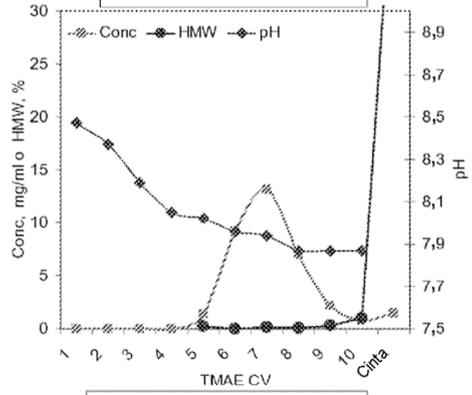


FIG. 11C

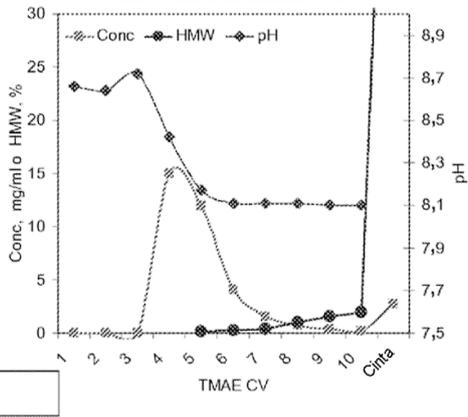


FIG. 11D

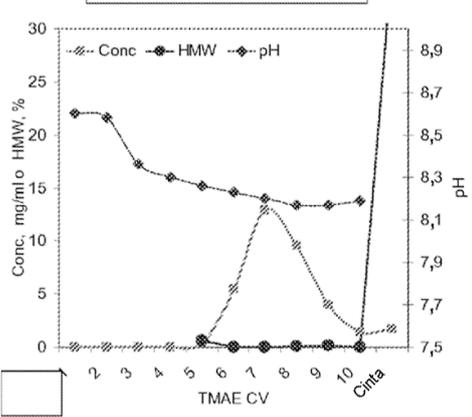


FIG. 11F

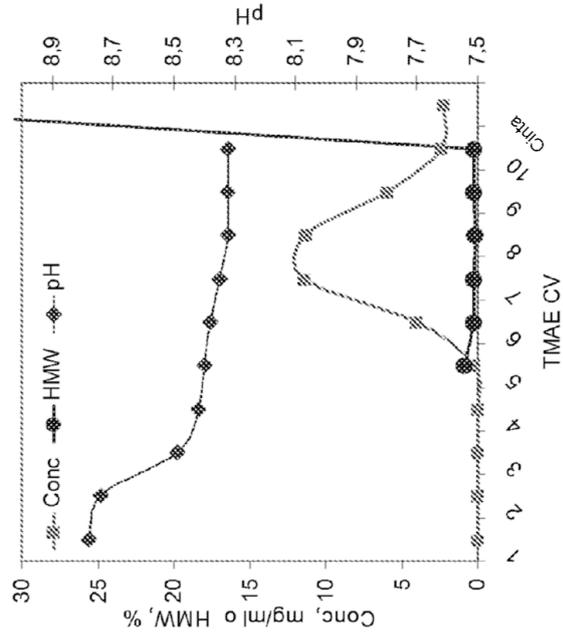


FIG. 11E

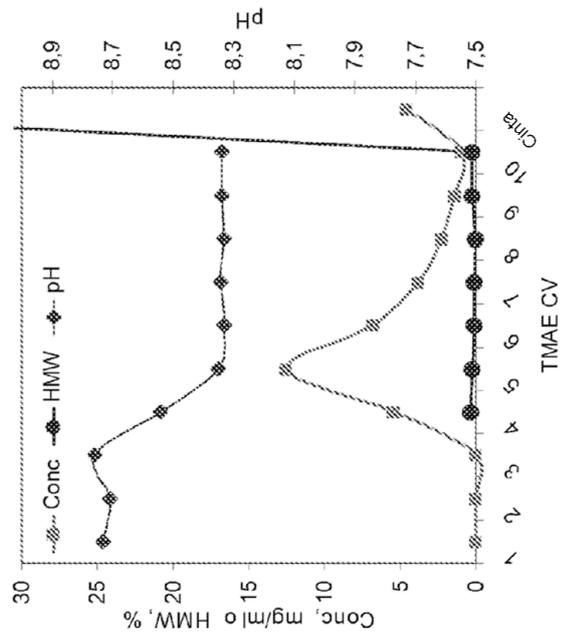


FIG. 12A

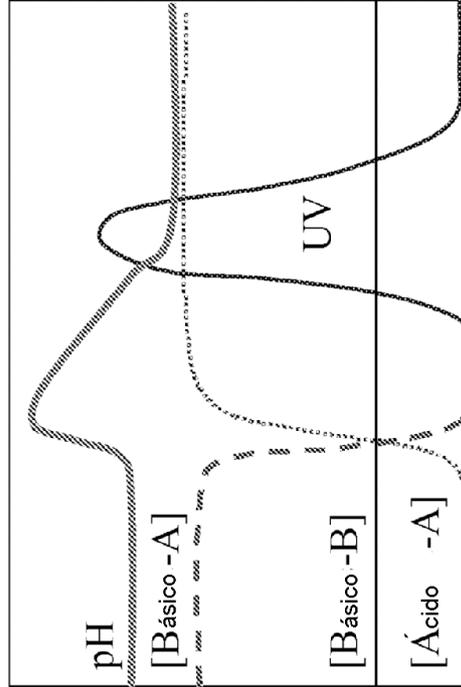


FIG. 12B

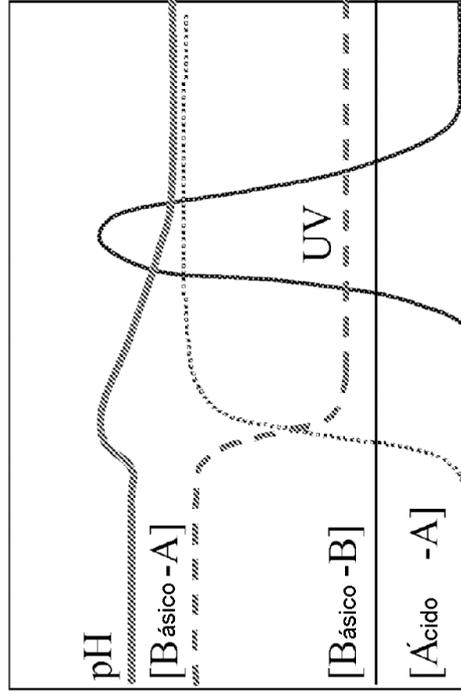


FIG. 13B

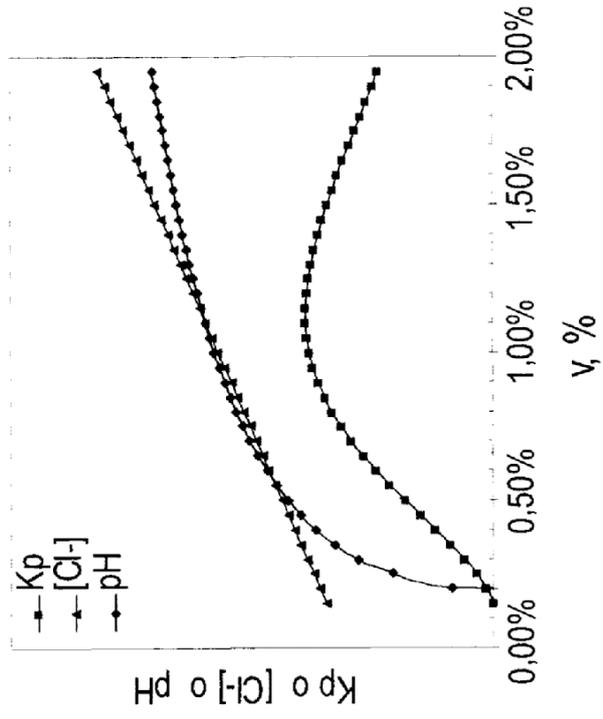


FIG. 13A

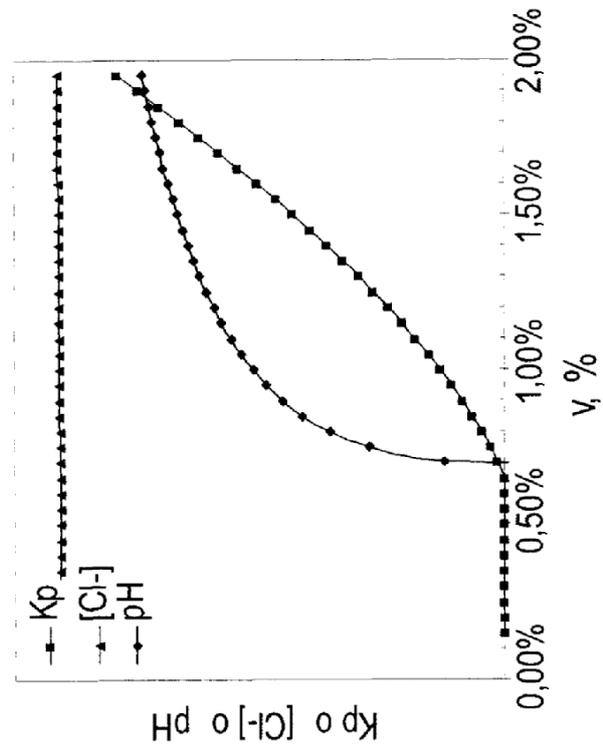


FIG. 14A

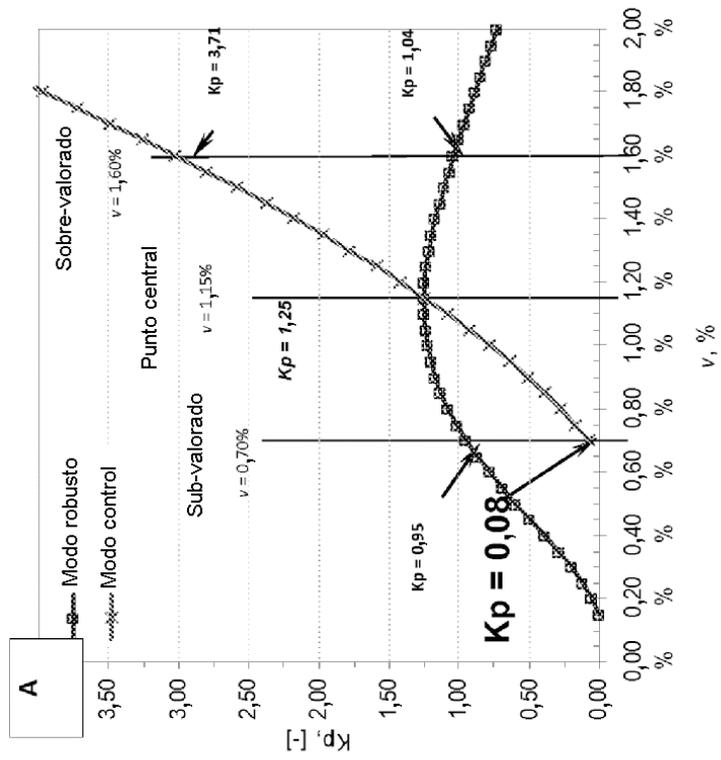


FIG. 14B

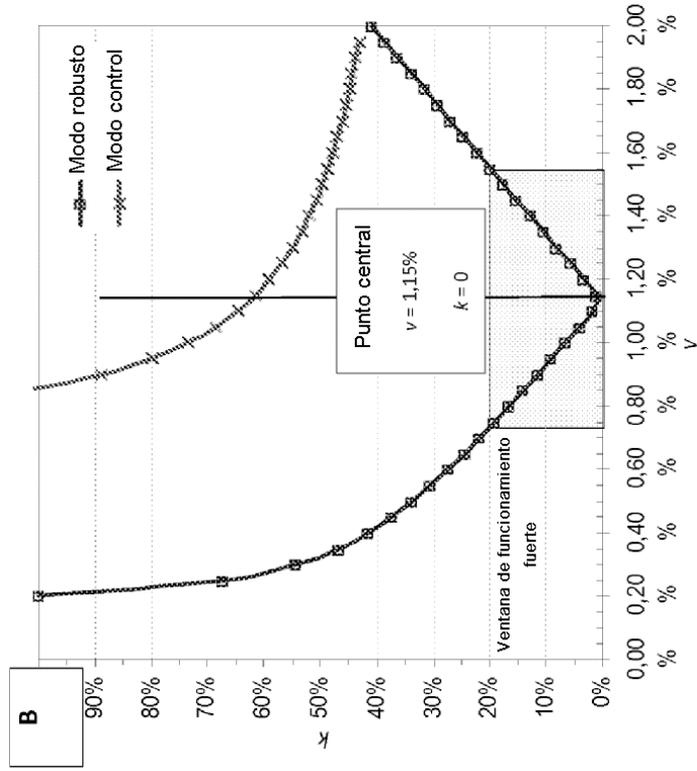


FIG. 15A

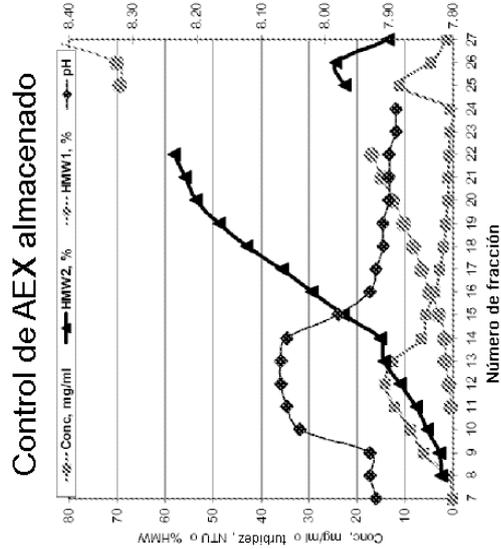


FIG. 15B

Actuación en tándem, Kp=1,5

Elución agresiva, en tándem (pH 3,5), sin Tris en el tampón de elución

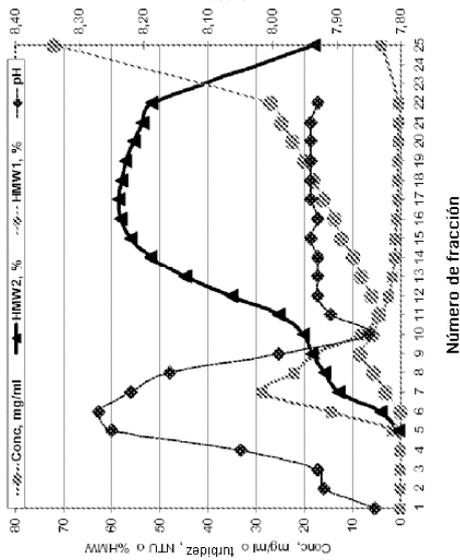


FIG. 15C

Elución suave, en tándem (pH 3,75) +Tris-HCl en el tampón de elución

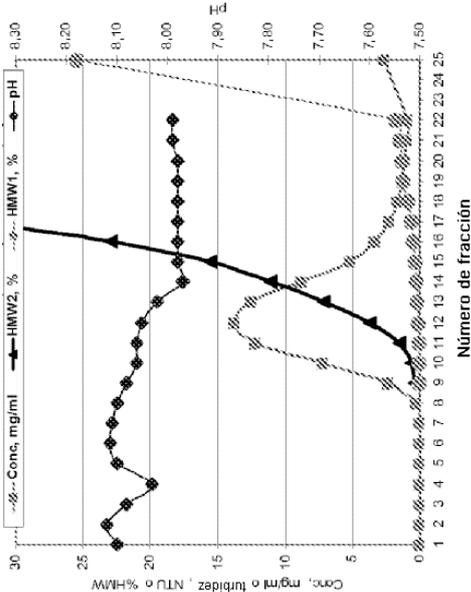
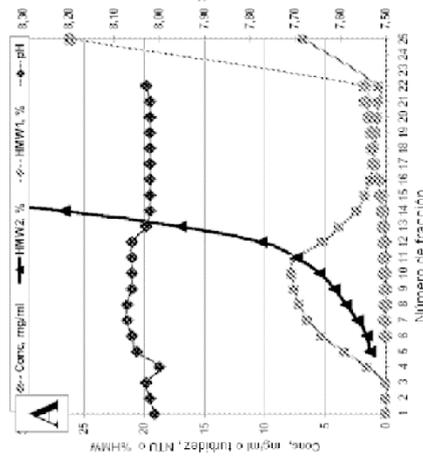


FIG. 16A

Control de AEX

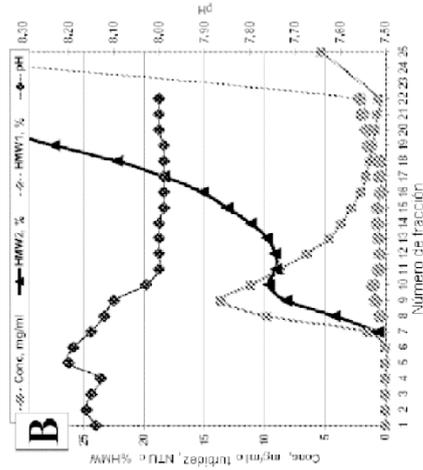


HMW1 = 0,04%
HCP: BLOQ
proA extraída: BLOQ

FIG. 16B

Actuación en tándem, Kp=3,0

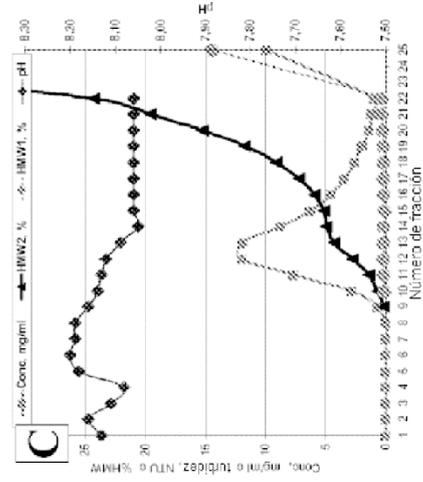
Elución agresiva, en tándem
+ Tris en el tampón de elución



HMW1 = 0,8%
HCP: BLOQ
proA extraída: BLOQ

FIG. 16C

Elución suave, en tándem
+Tris-HCl en el tampón de elución



HMW1 = 0,1%
HCP: BLOQ
proA extraída : 0.04 ppm