

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 268**

51 Int. Cl.:

C07K 1/30 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2003 E 10180577 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2261230**

54 Título: **Método de purificación de proteínas**

30 Prioridad:

11.09.2002 JP 2002265609

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

24.07.2017

73 Titular/es:

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
5-1, Ukima 5-chome
Kita-ku, Tokyo 115-8543, JP

72 Inventor/es:

TAKEDA, KOZO;
OCHI, NORIMICHI;
ISHII, KIMIE;
MATSUHASHI, MANABU y
IMAMURA, AKINORI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 626 268 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de purificación de proteínas

5 Campo de la técnica

La presente invención se refiere a un método para purificar proteínas, más específicamente a un método para eliminar impurezas, tales como ADN contaminantes, de una muestra que contiene una proteína fisiológicamente activa, tal como moléculas de anticuerpo.

10

Técnica anterior

Los avances en la tecnología recombinante de genes han permitido un suministro estable de varias formulaciones proteicas. En particular, en los últimos años se han desarrollado e introducido en ensayos clínicos diversos fármacos de anticuerpos recombinantes, que son más selectivos que los fármacos normales.

15

En estas formulaciones que contienen proteínas fisiológicamente activas producidas de forma recombinante existe la necesidad de eliminar el ADN y las impurezas del huésped (por ejemplo, contaminantes de ADN) asociados con la contaminación viral. Conforme a los criterios actuales de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cantidad de ADN en los fármacos biológicos no debe superar los 100 pg de ADN/dosis. Para cumplir este criterio, en general, un medio acuoso que contiene proteínas fisiológicamente activas procedentes de la célula huésped, se trata mediante cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de hidroxapatita o una combinación de las mismas, con el fin de eliminar el ADN.

20

En particular, en un caso donde una proteína fisiológicamente activa es un anticuerpo producido de forma recombinante en células huésped de mamífero, el medio acuoso se trata mediante cromatografía en columna de afinidad en la proteína A o G antes de purificarlo mediante varios tipos de cromatografía en base a la propiedad de unión de la proteína A o la proteína G a la cadena Fc de la IgG.

25

Como ejemplo, en el documento JP KOHYO 5-504579, un medio acuoso que contiene anticuerpos obtenido del cultivo de células de mamífero, se somete a cromatografía en columna de proteína A/G para adsorber las moléculas de anticuerpo sobre la columna, seguido de elución con una solución ácida (ácido cítrico aproximadamente 0,1M, pH 3,0-3,5) para liberar las moléculas de anticuerpo. La fracción ácida eluida resultante se somete secuencialmente a cromatografía en columna de intercambio iónico y a cromatografía en columna de exclusión por tamaño para producir las moléculas de anticuerpo purificadas. En el documento WO 95/22389, los anticuerpos se purifican mediante cromatografía en columna de la proteína A, seguida de intercambio catiónico y cromatografía de interacción hidrofóbica.

30

35

No obstante, estos procesos cromatográficos individuales y las combinaciones de los mismos, requieren tiempo, son laboriosos y costosos, además de ser complicados. Además, no proporcionan resultados estables.

40

Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar un método más simple y menos caro para purificar proteínas fisiológicamente activas, especialmente anticuerpos, que puede garantizar la eliminación de impurezas, tales como ADN contaminantes, y que pueden minimizar una pérdida de proteínas fisiológicamente activas.

45

Divulgación de la invención

Como resultado de los intensos y extensos esfuerzos realizados para superar estos problemas, los inventores de la presente invención han realizado el sorprendente hallazgo de que las impurezas, tales como los contaminantes de ADN y los virus, se pueden eliminar con eficiencia de una muestra que contiene proteína fisiológicamente activa sin usar procesos cromatográficos complicados cuando la muestra se forma en una solución acuosa de baja conductividad a un pH inferior al punto isoeléctrico de la proteína fisiológicamente activa y, después, se filtra a través de un filtro para eliminar las partículas resultantes. Este hallazgo condujo a la realización de la presente invención.

50

A saber, la presente invención proporciona los puntos siguientes:

55

1. Un método para eliminar virus en una muestra que contiene anticuerpo, que comprende las etapas de:

- 1) someter la muestra que contiene anticuerpo a columna de cromatografía de afinidad en la proteína A o G;
- 2) eluir la muestra con una solución acuosa ácida de baja conductividad de 0 a 50 mM,
- 3) ajustar la fracción eluida resultante con un tampón a un pH igual o inferior al punto isoeléctrico del anticuerpo, donde la molaridad de la fracción eluida ajustada es de 0 a 50 mM; y
- 4) eliminar las partículas resultantes.

60

2. El método de acuerdo con el punto 1, donde la solución acuosa ácida de baja conductividad tiene una conductividad de 0 a 300 mM, expresado en molaridad.

65

3. El método de acuerdo con el punto 1 o 2, donde la solución acuosa ácida de baja conductividad tiene una fuerza iónica de 0 a 0,2.
- 5 4. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, donde la solución acuosa ácida de baja conductividad tiene una conductividad de 0 a 300 mS/m.
5. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 4, donde la solución acuosa ácida se selecciona de soluciones acuosas de ácido clorhídrico, ácido cítrico y ácido acético.
- 10 6. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 5, donde el pH de la fracción eluida resultante se ajusta a igual o inferior al punto isoeléctrico del anticuerpo e igual o superior a pH 2,0.
- 15 7. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 6, donde la muestra que contiene anticuerpo tiene los virus a un título de virus de 1,03 ($\text{Log}_{10}/\text{ml}$) o menos después del tratamiento de eliminación de virus.
8. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 7, donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG.
9. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 8, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado.
- 20 10. El método de acuerdo con el punto 9, donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado.
11. El método de acuerdo con el punto 9, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-antígeno HM1.24 humanizado.
- 25 12. El método de acuerdo con el punto 9, donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-péptido relacionado con la hormona paratiroidea humanizado (anticuerpo anti-PTHrP).
- 30 13. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 12, donde las partículas se eliminan mediante filtración a través de un filtro.
14. El método de acuerdo con el punto 1, donde el tampón es una solución acuosa de Tris.
- 35 15. Un método para fabricar una formulación de anticuerpo médica, que comprende una etapa de purificación donde se usa el método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 14. Además, se divulga lo siguiente:
- (1) Un método para eliminar impurezas en una muestra que contiene una proteína fisiológicamente activa, que comprende las etapas de:
- 40 1) formar la muestra que contiene la proteína fisiológicamente activa en una solución acuosa de baja conductividad que tiene un pH igual o inferior al punto isoeléctrico de la proteína fisiológicamente activa; y
2) eliminar las partículas resultantes.
- 45 (2) El método de acuerdo con (1) anterior, donde la solución acuosa de baja conductividad tiene una conductividad de 0 a 100 mM, expresado en molaridad.
- (3) El método de acuerdo con (1) o (2) anteriores, donde la solución acuosa de baja conductividad tiene una fuerza iónica de 0 a 0,2.
- (4) El método de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3) anteriores, donde la solución acuosa de baja conductividad tiene una conductividad de 0 a 300 mS/m.
- 50 (5) El método de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4) anteriores, donde la solución se selecciona de soluciones acuosas de ácido clorhídrico, ácido cítrico y ácido acético.
- (6) El método de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (5) anteriores, donde el pH de la solución acuosa es igual o inferior al punto isoeléctrico de la proteína fisiológicamente activa e igual o superior a pH 2,0.
- (7) El método de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (6) anteriores, donde las impurezas son contaminantes del ADN.
- 55 (8) El método de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (6) anteriores, donde las impurezas son virus.
- (9) El método de acuerdo con (7) anterior, donde la muestra que contiene proteína fisiológicamente activa tiene los contaminantes del ADN a una concentración de ADN de 22,5 pg/ml o menor después del tratamiento de eliminación de los contaminantes del ADN.
- 60 (10) El método de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (9) anteriores, donde la proteína fisiológicamente activa es un anticuerpo.
- (11) El método de acuerdo con (10) anterior, donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG.
- (12) El método de acuerdo con (10) u (11) anteriores, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado.
- 65 (13) El método de acuerdo con (12) anterior, donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado.

(14) El método de acuerdo con (12) anterior, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-antígeno HM1.24 humanizado.

(15) El método de acuerdo con (12) anterior, donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-péptido relacionado con la hormona paratiroidea humanizado (anticuerpo anti-PTHrP).

(16) El método de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (9) anteriores, donde la proteína fisiológicamente activa es un factor estimulante de colonias de granulocitos.

(17) El método de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (16) anteriores, donde las partículas se eliminan mediante filtración a través de un filtro.

(18) El método de acuerdo con (1) anterior, donde la etapa 1) se logra formando la muestra que contiene la proteína fisiológicamente activa en una solución acuosa ácida o alcalina de baja conductividad y ajustando la muestra resultante con un tampón hasta un pH igual o menor que el punto isoeléctrico de la proteína fisiológicamente activa.

(19) El método de acuerdo con (1) anterior,

donde la proteína fisiológicamente activa es un anticuerpo, y

donde la etapa 1) se logra sometiendo la muestra que contiene anticuerpo a cromatografía de afinidad en la proteína A o G, eluyendo la muestra con una solución acuosa ácida de baja conductividad y ajustando la fracción eluida resultante con un tampón a un pH igual o menor que el punto isoeléctrico del anticuerpo.

(20) El método de acuerdo con (18) o (19) anteriores, donde el tampón es una solución acuosa de Tris.

(21) una proteína fisiológicamente activa purificada obtenible mediante el método de acuerdo con una cualquiera de (1) a (20) anteriores.

(22) Un método para fabricar una formulación proteica médica, que comprende una etapa de purificación donde se usa el método de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (20) anteriores.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Los ejemplos de proteína fisiológicamente activa contenida en una muestra que se va a purificar mediante el método de la presente invención, incluyen anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, y son más preferidos los anticuerpos monoclonales. En una forma de realización de la presente invención, para la purificación usando cromatografía de afinidad con proteína A/G, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos se clasifican en las clases IgG, IgA, IgE, IgD e IgM, prefiriéndose los anticuerpos IgG.

Se entiende que la expresión "proteína fisiológicamente activa" significa una proteína que tienen sustancialmente las mismas actividades biológicas como una correspondiente proteína fisiológicamente activa de origen mamífero (especialmente de ser humano). Dicha proteína puede ser nativa o genéticamente recombinante, preferentemente genéticamente recombinante. Las proteínas fisiológicamente activas, genéticamente recombinantes, se pueden preparar mediante la producción en células bacterianas tales como *E. coli*; células de levadura; o células cultivadas procedentes de animales tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células C127 o células COS. Las proteínas preparadas de este modo se aíslan y purifican de varias formas antes de usar. Dichas proteínas genéticamente recombinantes abarcan las que tienen la misma secuencia de aminoácidos que la correspondiente proteína nativa, así como las que comprenden delección, sustitución o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos pero que retienen las actividades biológicas mencionadas anteriormente. Adicionalmente, dichas proteínas incluyen las modificadas químicamente, por ejemplo con PEG. etc.

Cuando una proteína fisiológicamente activa es una glicoproteína, puede tener cadenas de azúcar de cualquier origen, preferentemente de origen mamífero. Los orígenes de mamífero incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células BHK, células COS y células procedentes de ser humano, siendo las más preferidas las células CHO.

Además, se divulga que una proteína fisiológicamente activa puede ser EPO, que se puede preparar de cualquier modo, por ejemplo obteniendo de orina humana de varias formas u produciéndola con técnicas de ingeniería genética en células bacterianas tales como *E. coli*, células de levadura, células de ovario de hámster chino (CHO); células BHK, células COS o células procedentes de ser humano o similares (por ejemplo, como se describe en el documento JP KOKAI 61-12288). La EPO preparada de este modo se extrae, se aísla y se purifica de varias formas antes de usar. Además, la EPO se puede modificar químicamente, por ejemplo con PEG etc. (véase la publicación internacional n.º WO90/12874). La EPO, como se usa en el presente documento, incluye adicionalmente las que están inicialmente sin glicosilar pero químicamente modificadas con PEG, etc. Asimismo, también se incluyen análogos de la EPO, que están modificados para tener al menos un sitio adicional para glicosilación unida a N o unida a O en la secuencia de aminoácidos de la EPO (véanse, por ejemplo, los documentos JP KOKAI 08-151398, JP KOHYO 08-506023). En lugar de incrementar el número de sitios de glicosilación, los análogos de la EPO también se pueden modificar para tener un contenido incrementado de cadenas de azúcar, tales como ácido siálico para una cantidad incrementada de cadenas de azúcar.

Además, se divulga que una proteína fisiológicamente activa puede ser G-CSF, se puede usar cualquier G-CSF siempre que esté altamente purificado. El G-CSF como se usa en el presente documento se puede preparar de cualquier forma, por ejemplo obteniendo de líneas de células tumorales humanas cultivadas o produciendo con técnicas de ingeniería genética en células bacterianas, tales como *E. coli*, células de levadura; células cultivadas

procedentes de animales tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células C127 o células COS. El G-CSF preparado de este modo se extrae, se aísla y se purifica de varias formas antes de usar. Se prefieren los producidos de forma recombinante en células *E. coli*, células de levadura; células CHO. Los más preferidos son los producidos de forma recombinante en células CHO. Además, EL G-CSF se puede modificar químicamente, por ejemplo con PEG etc. (véase la publicación internacional n.º WO90/12874).

Cuando una proteína fisiológicamente activa es un anticuerpo monoclonal, se puede preparar de cualquier modo. En principio, se puede producir un anticuerpo monoclonal usando técnicas conocidas mediante inmunización de un antígeno sensibilizante de acuerdo con procedimientos convencionales para inmunización, fusionando los inunecitos resultantes con células parentales conocidas mediante procedimientos convencionales para fusión celular y, después, cribando las células productoras de anticuerpos monoclonales a través de procedimientos convencionales para el cribado.

Como alternativa, los genes de anticuerpos se clonan a partir de hibridomas, se integran en vectores adecuados y después se transforman en huéspedes para producir moléculas de anticuerpo usando tecnología de recombinación génica. Los anticuerpos genéticamente recombinantes producidos de este modo también se pueden usar en la presente invención (véase, por ejemplo, Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Más específicamente, el ADNc de los dominios variables de anticuerpo (dominios V) se sintetiza a partir de ARNm de hibridoma usando la transcriptasa inversa. Tras la obtención de ADN que codifica los dominios V del anticuerpo diana, el ADN está ligado al ADN que codifica los dominios constantes del anticuerpo deseado (dominios C) y se integran en un vector de expresión. Como alternativa, el ADN que codifica los dominios V del anticuerpo se puede integrar en un vector de expresión portador del ADN de los dominios C del anticuerpo. La construcción de ADN se integra en un vector de expresión de forma que se expresa bajo el control de una región reguladora de la expresión, por ejemplo un potenciador o un promotor. Después, las células huésped se transforman con este vector de expresión para la expresión de anticuerpos.

En la presente invención, es posible usar anticuerpos genéticamente recombinantes (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados) que se modifican artificialmente con el fin de atenuar las características como heteroantígeno para el ser humano, Estos anticuerpos modificados se pueden preparar de un modo conocido. Un anticuerpo quimérico está compuesto por dominios variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de mamífero no humano (por ejemplo, ratón) y dominios constantes de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo humano. Para obtener anticuerpos quiméricos, los ADN que codifican dichos dominios variables de anticuerpo de ratón pueden ligarse a ADN que codifican los dominios constantes de anticuerpo humano y después se integran en un vector de expresión, seguido de transformación en un huésped para la producción de anticuerpos.

Los anticuerpos humanizados también se denominan anticuerpos humanos reformados y se obtienen mediante injerto de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de anticuerpos de mamífero no humanos (por ejemplo, ratón) para sustituir a las de anticuerpos humanos. También se conocen procedimientos de recombinación génica estándar para este fin. Más específicamente, una secuencia de ADN diseñada para permitir la unión entre CDR de anticuerpo de ratón y las regiones marco (FR) de anticuerpo humano se sintetizan mediante PCR de varios oligonucleótidos que se preparan para que tengan secciones solapantes unas con otras en los extremos. El ADN obtenido de este modo se liga al ADN que codifica los dominios constantes del anticuerpo humano y se integra en un vector de expresión, seguido de transformación en un huésped para producir anticuerpos (véase la publicación de patente europea n.º EP 239400 y la publicación internacional n.º WO 96/02576). Las FR del anticuerpo humano, que se liga a través de las CDR, se seleccionan de un modo tal que las regiones determinantes de la complementariedad formen un sitio de unión a antígeno favorable. En caso necesario, se pueden efectuar sustituciones de aminoácidos en las regiones marco de los dominios variables de anticuerpo de forma que las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo humanizado reformado pueden formar un sitio de unión a antígeno adecuado (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

Un anticuerpo del receptor anti-IL-6 humanizado (hPM-1) se pueden presentar como ejemplo preferido para dichos anticuerpos humanizados reformados (véase la publicación internacional n.º WO92-19759). Además de esto, también se prefieren para su uso en la presente invención un anticuerpo monoclonal anti-antígeno HM1.24 humanizado (véase la publicación internacional n.º WO98-14580), un anticuerpo anti-péptido relacionado con la hormona paratiroidea humanizado (anticuerpo anti-PTHrP, véase la publicación internacional n.º WO98-13388) y un anticuerpo anti-factor tisular humanizado (véase la publicación internacional n.º WO99-51743) y similares.

Los procedimientos para obtener anticuerpos humanos también se conocen. Por ejemplo, los linfocitos humanos se sensibilizan in vitro con un antígeno deseado o una célula de expresión del antígeno deseado y después los linfocitos sensibilizados se usan con células de mieloma humano (por ejemplo, U266) para dar los anticuerpos humanos deseados que tienen actividad de unión al antígeno (véase el documento JP KOKOKU 01-59878). Como alternativa, los animales transgénicos que tienen todos los repertorios de los genes de anticuerpos humanos se pueden inmunizar con un antígeno para obtener los anticuerpos humanos deseados (véase las publicaciones internacionales n.º WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 y WO 96/33735). Existen técnicas adicionales usando bibliotecas de anticuerpos humanos para dar anticuerpos humanos mediante

adsorción. Por ejemplo, los dominios variables de anticuerpo humano pueden expresarse cada uno como un anticuerpo de una sola cadena (scFv) sobre la superficie de los fagos mediante tecnología de expresión en fagos, seguido de selección de fagos que se unen al antígeno. Analizando los genes de los fagos seleccionados, es posible determinar las secuencias de ADN que codifican los dominios variables de anticuerpo humano que se unen al antígeno. Una vez que se han identificado las secuencias de ADN de la unión de ScFv al antígeno, las secuencias se pueden usar para construir vectores de expresión adecuados para obtener anticuerpos humanos. Estas técnicas ya se conocen bien y se pueden encontrar en los documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388.

Adicionalmente, también se prefieren los anticuerpos humanos producidos en animales transgénicos y similares.

Adicionalmente, el anticuerpo como se usa en el presente documento abarca fragmentos de anticuerpos, incluidos Fab, (Fab)₂, Fc, Fc' y Fd, así como anticuerpos reformados, incluidos anticuerpos de una sola cadena monovalentes o polivalentes (scFv).

Como se usa en el presente documento, preferentemente se entiende que la expresión "muestra que contiene proteína fisiológicamente activa" o una "muestra que contiene anticuerpo" significa un medio de cultivo de células de mamífero (por ejemplo, células CHO) que contienen moléculas proteicas o moléculas de anticuerpo fisiológicamente activas producidas mediante cultivo, que después pueden someterse a purificación parcial o a otro(s) tratamiento(s) determinado(s).

Como se divulga en el presente documento, las impurezas se eliminan en una muestra que contiene proteína fisiológicamente activa mediante un método que comprende las etapas de:

- 1) formar la muestra que contiene proteína fisiológicamente activa en una solución acuosa de baja conductividad a un pH igual o inferior al punto isoeléctrico de la proteína fisiológicamente activa; y
- 2) eliminar las partículas resultantes como se describe en las reivindicaciones.

Cualquier sustancia puede eliminarse como una impureza mediante el método de la presente invención, siempre y cuando no sea una proteína diana a purificar. Entre los ejemplos de tales impurezas se incluyen contaminantes de ADN, virus, proteína A (eluida de las columnas), endotoxinas, HCP (proteínas derivadas de las células huésped), así como componentes del medio Hy-Fish (FL) e IGF, siendo preferentes los contaminantes de ADN o los virus. Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "contaminantes de ADN" significa moléculas de ADN presentes en una muestra que contiene proteína fisiológicamente activa. Los ejemplos incluyen ADN derivados del huésped y ADN virales derivados de contaminación.

No hay una limitación concreta al tipo de virus que se va a eliminar mediante el procedimiento de la presente invención. Se puede eliminar cualquier virus, incluyendo virus de ADN y de ARN. Los ejemplos de virus de ARN incluyen retrovirus (por ejemplo, X-MuLV), reovirus (por ejemplo, Reo 3) y parvovirus (por ejemplo, MVM). Los ejemplos ilustrativos de virus eliminados mediante el método de la presente invención incluyen, por ejemplo, X-MuLV, PRV, Reo 3, MVM, VSV, herpes simple, CHV, Sindbis, paperas, viruela, sarampión, rubéola, gripe, herpes zóster, citomegalovirus, parainfluenza, EB, HIV, HA, HB, NANB, ATL, ECHO y parvovirus, prefiriéndose X-MuLV, Reo 3, MVM y PRV.

Como se usa en el presente documento, generalmente se entiende que la expresión "solución acuosa de baja conductividad" significa una solución acuosa que tiene una molaridad de 0 a 100 mM, preferentemente de 0 a 50 mM, más preferentemente de 0 a 30 mM, o que tiene una fuerza iónica de 0 a 0,2, preferentemente de 0 a 0,12, o que tiene una conductividad de 0 a 200 mS/m, preferentemente de 0 a 200 mS/m, más preferentemente de 0 a 150 mS/m.

El punto isoeléctrico de una proteína fisiológicamente activa se refiere al valor de pH al cual la proteína fisiológicamente activa no tiene una carga neta aparente en una solución acuosa. El punto isoeléctrico se puede determinar de un modo conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo por medio del enfocado isoeléctrico donde una proteína fisiológicamente activa se somete a electroforesis en soluciones de varios niveles de pH para determinar el pH al cual la proteína no migrará. Un pH igual o inferior al del punto isoeléctrico de una proteína fisiológicamente activa es, preferentemente, un pH por debajo del punto isoeléctrico de la proteína fisiológicamente activa.

Cuando las impurezas son moléculas de ADN en el método de la presente invención, preferentemente el pH se ajusta a un nivel igual o inferior al punto isoeléctrico de una proteína fisiológicamente activa, de modo que la proteína fisiológicamente activa está cargada positivamente y las moléculas de ADN están cargadas negativamente.

En general, el ADN tiene cargas iónicas negativas muy fuertes que son el resultado de los grupos fosfato en la estructura (los grupos fosfato hallados dentro de los enlaces fosfodiéster fuertemente ácidos en los ácidos nucleicos tienen un valor de pK de aproximadamente 1). Por esta razón, el ADN puede estar cargado negativamente a cualquier pH y es posible usar un pH deseado en el intervalo de igual o inferior al punto isoeléctrico de una proteína

fisiológicamente activa. Dado que el nivel de pH requerido variará entre diferentes tipos de proteínas fisiológicamente activas, los expertos en la técnica pueden seleccionar un nivel de pH deseado en el intervalo de igual o inferior al punto isoeléctrico de una proteína fisiológicamente activa de una forma conocida, por ejemplo preparando muchas muestras con pH diferentes y midiendo sus parámetros, tales como el % de eliminación de ADN y el % de recuperación de proteínas, como se describe en la sección de Ejemplos más adelante. Dicho pH es, normalmente un pH de 2,0 o mayor, preferentemente un pH de 3,0 o mayor y, particularmente preferentemente un pH de 4,0 o mayor.

Para confirmar si las moléculas de ADN están cargadas negativamente, se pueden usar procedimientos conocidos tales como los que usan una curva de titulación electroforética (CTE) (véase Ion Exchange Chromatography Principles and Methods, Pharmacia (recientemente Amersham Biosciences), pp. 52-56).

Además, en el método de la presente invención, una muestra que contiene proteína fisiológicamente activa también se puede convertir en una solución acuosa ácida o alcalina de baja conductividad, seguido de ajuste de la muestra resultante con un tampón hasta un pH igual o inferior al punto isoeléctrico de la proteína fisiológicamente activa.

Por tanto, como se divulga en la presente invención, se eliminan las impurezas en una muestra que contiene proteína fisiológicamente activa mediante un método que comprende las etapas de:

- 1) convertir la muestra que contiene proteína fisiológicamente activa en una solución acuosa ácida o alcalina de baja conductividad;
- 2) ajustar la muestra resultante con un tampón a un pH igual o inferior al punto isoeléctrico de la proteína fisiológicamente activa; y
- 3) eliminar las partículas resultantes. Las impurezas eliminadas mediante el método de la presente invención son como se ha descrito anteriormente.

Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "solución acuosa ácida de baja conductividad" significa una solución acuosa de pH 2,0 a pH 3,9, preferentemente de pH 2,0 a pH 3,0, que tiene una molaridad de 0 a 100 mM, preferentemente de 0 a 50 mM, más preferentemente de 0 a 30 mM, o que tiene una fuerza iónica de 0 a 0,2, preferentemente de 0 a 0,12, o que tiene una conductividad de 0 a 300 mS/m, preferentemente de 0 a 200 mS/m, más preferentemente de 0 a 150 mS/m. La solución acuosa ácida se puede seleccionar de soluciones acuosas de ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido acético y otros ácidos. El tipo, la conductividad y el pH de la solución acuosa ácida de baja conductividad variarán en función del tipo de proteína fisiológicamente activa o anticuerpo que se va a purificar. Los expertos en la técnica determinarán fácilmente las condiciones óptimas para estos parámetros en experimentos preliminares, como se describe en el presente documento.

Asimismo, como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "solución acuosa ácida de baja conductividad" significa una solución acuosa normalmente de pH 7,5 a pH 13, que tiene una molaridad de 0 a 100 mM, preferentemente de 0 a 50 mM, más preferentemente de 0 a 30 mM, o que tiene una fuerza iónica de 0 a 0,2, preferentemente de 0 a 0,12, o que tiene una conductividad de 0 a 300 mS/m, preferentemente de 0 a 200 mS/m, más preferentemente de 0 a 150 mS/m. El pH de esta solución variará en función del tipo de proteína fisiológicamente activa o anticuerpo que se va a purificar.

En el método de la presente invención, después de convertir una muestra que contiene proteína fisiológicamente activa en una solución acuosa ácida de baja conductividad, la muestra resultante se ajusta con un tampón hasta un pH igual o inferior al punto isoeléctrico de la proteína fisiológicamente activa. Los ejemplos de un tampón incluyen Tris-HCl, fosfato, Tris, Na₂HPO₄ y NaOH.

Además, en la presente invención, una muestra que contiene anticuerpo normalmente se puede someter a cromatografía de afinidad en la proteína A o G y luir con una solución acuosa ácida de baja conductividad, seguido de ajustar la fracción eluida resultante con un tampón hasta un pH deseado en el intervalo de igual o inferior al punto isoeléctrico de la proteína fisiológicamente activa.

Por tanto, en todavía otra realización preferida de la presente invención se eliminan las impurezas en una muestra que contiene proteína fisiológicamente activa mediante un método que comprende las etapas de:

- 1) someter una muestra que contiene anticuerpo a cromatografía de afinidad en la proteína A o G y eluir la muestra con una solución acuosa ácida de baja conductividad;
- 2) ajustar la fracción eluida resultante con un tampón a un pH igual o inferior al punto isoeléctrico de la proteína fisiológicamente activa; y
- 3) eliminar las partículas resultantes de acuerdo con las reivindicaciones. Las impurezas eliminadas mediante el método de la presente invención son como se ha descrito anteriormente.

La solución acuosa ácida de baja conductividad usada en este método puede ser cualquiera de las indicadas anteriormente. Los ejemplos de un tampón incluyen Tris-HCl, fosfato, Tris, Na₂HPO₄ y NaOH.

En el método de la presente invención, la solución ajustada a un pH igual o inferior al punto isoeléctrico de la proteína fisiológicamente activa en la etapa anterior, a su vez, produce partículas (es decir, se enturbia). Estas partículas se pueden eliminar mediante filtración a través de un filtro para garantizar una eliminación suficiente de las impurezas tales como los contaminantes de ADN. Ejemplos de un filtro disponible para filtración incluyen, entre otros, un sistema de filtro de acetato de celulosa de 1,0 - 0,2 μm (Corning) o TFF.

Como alternativa, estas partículas también se pueden eliminar mediante centrifugación o cualquier otra técnica para una eliminación eficiente de partículas; los procedimientos para la eliminación no están limitados a la filtración a través de un filtro.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los inventores de la presente invención estiman que cuando las impurezas son moléculas de ADN, cada una de estas partículas es un conjugado formado entre la proteína activa fisiológicamente y el ADN. También estiman que cuando el Ph se ajusta por debajo del punto isoeléctrico de una proteína, la proteína está cargada positivamente y las moléculas de ADN están cargadas negativamente, lo que tiene como resultado una conjugación entre ADN y proteína. Además, la conversión en una solución acuosa de baja conductividad potenciará adicionalmente la conjugación. La eliminación de las partículas mediante filtración tiene como resultado una pérdida pequeña de proteína fisiológicamente activa porque se elimina en forma de conjugados de ADN-proteína fisiológicamente activa. No obstante, dicha pequeña pérdida constituye solo un pequeño porcentaje de la cantidad total de la proteína fisiológicamente activa; aproximadamente el 90 % de la proteína fisiológicamente activa se puede recuperar, como se describirá en la sección Ejemplo más adelante.

Los inventores de la presente invención también estiman que la cromatografía en columna de proteína A/G sola puede no ser suficiente para asegurar la separación eficaz entre el contaminante de ADN y la proteína fisiológicamente activa porque se forman conjugados de ADN-proteína en la resina de la columna. La proteína fisiológicamente activa purificada de este modo está disponible para su uso como formulación farmacéutica tras la posterior purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de hidroxapatita o combinaciones de las mismas.

El ensayo de ADN cuantitativo se puede conseguir, sin limitaciones, el ensayo de ADN total umbral junto con extracción de ADN antes del ensayo.

El ensayo cuantitativo de virus se puede realizar mediante, sin limitaciones, ensayo de DICT50 (dosis infecciosa de cultivo tisular (50 %)), que se mide mediante la infectividad vital en las células de detección en combinación con RT/Q-PCR y Q-PCR que permiten la determinación de la cantidad de virus en fracciones.

A continuación, la presente invención se describirá adicionalmente en los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Investigación de la composición tampón para la cromatografía de afinidad de proteína A en la purificación de hPM-1 (anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado)

1.1. Procedimientos de la prueba

(1) Material de prueba (muestra que contiene anticuerpo)

Una muestra que contiene el medio de cultivo (en lo sucesivo en el presente documento abreviado a MC) de células CHO productoras del anticuerpo hPM-1 (anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado), que se ha centrifugado para eliminar las células y almacenarlas a -80 °C, se filtró a través de un sistema de filtro de acetato de celulosa (abreviado a AC) de 0,22 μm (CORNING) y se usó como muestra de prueba para investigación de purificación. El anticuerpo hPM-1 se preparó como se describe en el ejemplo de referencia 2 del documento JP KOKAI 08-99902 usando el promotor Iα del factor de elongación humano mostrado en el Ejemplo 10 de la publicación internacional n.º WO92/19759 (punto isoeléctrico: pH 9,0).

(2) Instrumento usado para el examen

Para la fracción eluida de HCl

HPLC:	L-6200 Intelligent Pump (HITACHI) Detector L-4200 UV-VIS (HITACHI) D-2500 Chromato-Integrator (HITACHI)
Columna:	HR5/2 (Pharmacia), DI de 5 mm × 20 mm de A
Medios:	POROS 50A (PerSeptive), Lote de 0,4 ml; A250-039, Code; SPECIAL

HPLC:	<u>Para las partículas</u> Waters PrepLC4000 System (Waters) Waters2000 System Controller (Waters) Waters486 Tunable Absorbance Detector (Waters) Waters741 Data Module (Waters)
Espectrofotómetro:	U-2000 (HITACHI)
Columna:	XK26 (Pharmacia), DI de 26 mm × 100 mm de A
Medios:	POROS 50A (PerSeptive), Lote de 53 ml; A250-039, Code; SPECIAL

(3) Análisis y ensayo

Ensayo hPM-1:

5 hPM-1 se analiza mediante HPLC de fase inversa en una columna PLRP-S (Polymer Laboratories) con un gradiente lineal. Ensayo de ADN:

10 El ADN se mide mediante el ensayo de ADN total del umbral. Antes del ensayo se realiza extracción de ADN (por ejemplo, usando un kit de extracción de ADN, Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.). Asimismo, para la medición se usa un kit de ensayo de ADN total del umbral (Molecular Devices).

Turbidimetría:

15 Cada muestra de ensayo se monitoriza para determinar la formación de partículas midiendo su absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro U-2000 (HITACHI).

1.2. Investigación y condiciones de elución

20 Las condiciones de la elución se investigaron a varias composiciones tampón para determinar la elución en la cromatografía de afinidad de proteína A midiendo el % de recuperación de hPM-1 y la eliminación del ADN mediante elución. La muestra que contiene anticuerpo anterior se sometió a la columna en las condiciones indicadas en la Tabla 1 siguiente. La resina de la proteína A se equilibró con el tampón de equilibrado indicado en la Tabla 1 y después se cargó con la muestra que contiene el anticuerpo anterior, seguido de lavado 1, lavado 2 y elución. El perfil de elución se monitorizó a A280 para aislar un pico de proteína. En la tabla, el tampón C-P indica tampón citrato-fosfato.

Tabla 1

	Método de elución 1	Método de elución 2	Método de elución 3
Equilibrado	NaCl 1M/Tampón C-P 100mM pH 7,5	NaCl 1M/Tampón C-P 10 mM pH 7,5	NaCl 1M/Tampón C-P 100mM pH 7,5
Lavado 1	NaCl 1M/Tampón C-P 100mM pH 7,5	NaCl 1M/Tampón C-P 10 mM pH 7,5	NaCl 1M/Tampón C-P 100 mM pH 7,5
Lavado 2	Tampón C-P 100 mM pH 7,5	Tampón C-P 10 mM pH 7,5	Tampón C-P 100 mM pH 7,5
Elución	Tampón C-P 100 mM pH 2,6	HCl 2,5 mM pH 2,6	HCl 2,5 mM pH 2,6

30 No se observaron diferencias cromatográficas entre los métodos de elución 1, 2 y 3.

Cada fracción de elución se ajustó a pH 7,0 con solución Tris 300 mM, lo que indica que las partículas se generaban en las fracciones eluidas con HCl (métodos de elución 2 y 3). Se realizó investigación adicional para determinar la correlación entre la formación de partículas y el % de recuperación de hPM-1 o la cantidad de ADN residual.

35 Para analizar la correlación de las partículas, la fracción eluida de HCl del método de elución 2 se suplementó con NaCl y se analizó la correlación entre concentraciones de NaCl (0 mM, 50 mM, 100 mM) y varios factores. En el análisis de la correlación entre las concentraciones de NaCl y varios factores, las muestras filtradas y sin filtrar se prepararon del siguiente modo: cada fracción de elución de proteína A suplementada con NaCl se ajustó a pH 7,0 con una solución Tris 300 mM y después se filtró o no a través de un filtro CA de 0,22 µm. Las muestras filtradas y no filtradas se midieron para el % de recuperación de hPM-1 (solo muestras filtradas) y la cantidad de ADN residual.

1.3. % de recuperación

45 El % de recuperación de hPM-1 se midió para los métodos de elución individuales. Como resultado, el % de recuperación fue tan elevado como de 98,6 % en el método de elución 1. Por el contrario, el % de recuperación varió de 83,8 % a 97,1 % en el método de elución 2 y de 83,5 % a 93,7 % en el método de elución 3, se estimó que estas

variaciones se debían a lo pequeño de la escala de análisis (volumen de la resina: 0,4 ml). Cuando la escala de purificación se aumentó, se confirmó que el % de recuperación de hPM-1 se estabilizó a 90 % o más (método de elución 2). Por tanto, también se descubrió que el % de recuperación de hPM-1 seguía siendo alto, incluso en la elución de HCl.

5

1.4. Correlación entre las concentraciones de NaCl en la fracción eluida de HCl y varios factores

La Tabla 2 resume los análisis de la correlación entre las concentraciones de NaCl en la fracción eluida de HCl y varios factores.

10

Tabla 2

Concentración de NaCl	0 mM	50 mM	100 mM
Turbidez (pH no ajustado)	0,004	0,007	0,011
Turbidez (pH ajustado)	0,252	0,049	0,020
% de recuperación de hPM-1 (filtrado) (%)	81	86	88
Cantidad de ADN (sin filtrar) (pg de ADN/mg de hPM-1)	98	220	241
Cantidad de ADN (filtrado) (pg de ADN/mg de hPM-1)	11	30	250

Para las muestras filtradas, el % de recuperación de hPM-1 fue del 88 % a NaCl 100 mM, 86 % a NaCl 50 mM y 81 % a NaCl 0 mM. La cantidad de ADN residual fue baja a NaCl 0 mM en las muestras filtradas y no filtradas. En particular, la muestra filtrada suplementada con NaCl 0 mM tenía un contenido de ADN muy bajo de 11 pg de ADN/mg de hPM-1.

15

Las muestras con pH ajustado con una turbidez más alta tienden a proporcionar un % de recuperación hPM-1 menor y una cantidad menor de ADN residual tras la filtración. Este resultado sugiere una elevada posibilidad de que tanto hPM-1 como el ADN contribuyen a la formación de partículas. Se ha estimado que hPM-1 y ADN probablemente interaccionen entre sí para formar partículas ajustando el pH a 7,0. Con objeto de conseguir un % de recuperación de hPM-1 más alto, es preferible incrementar la concentración de NaCl en la fracción eluida de HCl. Para disminuir una cantidad de ADN residual, por otro lado, es deseable eliminar la suplementación de NaCl en fracción eluida de HCl.

20

Ejemplo 2: Purificación del anticuerpo anti-PTHrP humanizado

Una muestra que contiene un anticuerpo anti-PTHrP humanizado (un medio de cultivo del cultivo de células CHO), filtrado a través de filtros CA SARTOBRAN P de 0,45 y 0,2 μm (sartorius) se purificó mediante cromatografía en columna de afinidad de proteína A en las condiciones indicadas más adelante. El anticuerpo anti-PTHrP se preparó como se describe en la publicación internacional n.º WO98/13388 (punto isoeléctrico: pH 8,3).

30

2.1. Condiciones experimentales

35 Aparato de purificación: Explorador AKTA (Amersham Pharmacia Biotech)

Columna: HR5/5, C10, XK-26 (Amersham Pharmacia Biotech) Resina: rProtein A Sepharose Fast Flow

Carga: carga directa del medio de cultivo (pH 6,6 a pH 7,5) Ajuste de la fracción de elución: Fracciones de elución se ajustan a varios niveles de pH con una solución Tris acuosa 1M y después se filtran a través de un filtro de acetato de celulosa (en lo sucesivo abreviado a AC) de 0,2 μm para eliminar el ADN (las condiciones se analizan en (1) más adelante).

40

La columna de la proteína A se equilibró suficientemente con tampón de citrato-fosfato que contiene NaCl 150 mM (pH 7,5) y después se cargó con el MC que contiene el anticuerpo anterior. Después, a columna se lavó con tampón de citrato-fosfato que contiene NaCl 150 mM (pH 7,5) para eliminar las impurezas no unidas, se lavó después con tampón de citrato-fosfato (pH 7,5) para disminuir la conductividad y después se eluyó con ácido cítrico acuoso 20 mM. El perfil de elución se monitorizó a A280 para aislar un pico de proteína. Esta fracción de elución de la proteína A se usó para el siguiente análisis de las condiciones.

45

50 2.2. Análisis de las condiciones de eliminación para el ADN residual en la fracción eluida

Para garantizar una eliminación eficiente de ADN residual, se investigó el pH óptimo para la filtración a través de un filtro. La fracción de elución de la proteína A se ajustó con una solución Tris acuosa 1,0 M a los siguientes niveles de pH. 2,7 (sin ajustar), 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 y 7,5. Después, se dejó que cada muestra reposara durante un periodo de tiempo dado, se filtró a través de un filtro de AC de 0,22 μm y después se ajustó a pH 7 con una solución

55

Tris acuosa 1,0 M, seguido de ensayo de ADN. En la tabla 3 se enumeran los niveles de pH examinados y los periodos de reposo, junto con la cantidad de ADN residual.

Tabla 3

Eliminación del ADN residual (unidad: pg/ml)									
	pH 7,5	pH 7,0	pH 6,5	pH 6,0	pH 5,5	pH 5,0	pH 4,5	pH 4,0	Directo (pH 2,7)
0 h	984	83,3	53,8	<22,5	<15,0	17,2	54,1	32,052	40,878
6 h	816	51,9	<15,0	<22,5	<15,0	<15,0	44,0	38,172	42,078
24 h	310	46,6	<15,0	<22,5	<15,0	<15,0	39,7	42,528	30,222
(ADN en el medio de cultivo: 6,637,200 µg/ml; ADN en la muestra sin filtrar: 25,110 pg/ml)									

5 Como se muestra en la tabla, la cantidad de ADN residual estaba por debajo del límite de detección a pH 5,5 y pH 6,0 en todos los casos en los que se dejó que las muestras reposaran durante 0, 6 y 24 horas. Asimismo, la eliminación de ADN residual alcanzó un pico aproximadamente a pH 5,5 y pH 6,0, mientras que se observó una menor eficiencia de la eliminación de ADN a niveles de pH mayores y menores.

10

Ejemplo 3: Purificación de anticuerpo monoclonal anti-antígeno HM1.24 humanizado

15 Una muestra que contiene un anticuerpo monoclonal anti-antígeno HM1.24 (un medio de cultivo del cultivo de células CHO) se purificó mediante cromatografía en columna de afinidad de proteína A en las condiciones indicadas en la Tabla 4 a continuación. El anticuerpo monoclonal anti-antígeno HM1.24 se preparó como se describe en la publicación internacional n.º WO98/14580 (punto isoeléctrico: pH 9,0).

3.1. Condiciones experimentales

20 Columna: rProtein A FF, 5 ml (DI 16 mm × A 25 mm)
Caudal: 5 ml/min (150 cm/h)
Muestra: carga directa del medio de cultivo

Tabla 4

Equilibrado (20 CV)	Tampón C-P 10 mM, NaCl 1M, pH 7,5
Carga	Carga directa de MC
Lavado 1 (20 CV)	Tampón C-P 10 mM, NaCl 1M, pH 7,5
Lavado 2 (20 CV)	Tampón C-P 10 mM, pH 7,5
Elución (10 CV)	Ácido cítrico, pH 2,5
Lavado 3 (4 CV)	NaOH 0,1M

25

La columna de la proteína A se equilibró suficientemente con tampón de citrato-fosfato que contiene NaCl 150 mM (pH 7,5) y después se cargó con el MC que contiene el anticuerpo anterior. Después, a columna se lavó con tampón de citrato-fosfato que contiene NaCl 150 mM (pH 7,5) para eliminar las impurezas no unidas, se lavó después con tampón de citrato-fosfato (pH 7,5) para disminuir la conductividad y después se eluyó con ácido cítrico acuoso 20 mM. El perfil de elución se monitorizó a A280 para aislar un pico de proteína. Esta fracción de elución de la proteína A se usó para la siguiente investigación de las condiciones.

30

3.2. Investigación de las condiciones de eliminación para el ADN residual en la fracción eluida

35 Para garantizar una eliminación eficiente de ADN residual, se investigó el pH óptimo para la filtración a través de un filtro. La fracción de elución de la proteína A se ajustó con una solución Tris acuosa 1,0 M a los siguientes niveles de pH (pH = 4,5-7,5). Después, se dejó que cada muestra reposara durante un periodo de tiempo dado, se filtró a través de un filtro de AC de 0,22 µm y después se ajustó a pH 7 con una solución Tris acuosa 1,0 M, seguido de ensayo de ADN y HPLC de fase inversa para el ensayo del anticuerpo monoclonal anti-antígeno HM1.24 humanizado. La Tabla 5 muestra los resultados del ensayo de ADN, mientras que la Tabla 6 muestra el rendimiento del anticuerpo monoclonal anti-antígeno HM1.24 humanizado.

40

Tabla 5

Eliminación del ADN residual (unidad: µg/ml)			
Experimento 1			
	pH 7,5	pH 6,5	pH 5,5
0 h	1142	624	113
6 h	3288	1157	117
(ADN en el medio de cultivo: 235200 pg/ml)			
Experimento 2			
	pH 5,5	pH 5,0	pH 4,5

Eliminación del ADN residual (unidad: µg/ml)			
Experimento 1			
0 h	137	67	86
6 h	94	34	164
(ADN en el medio de cultivo: 5448000 pg/ml; ADN en la muestra sin filtrar: 4330 µg/ml)			

Tabla 6

% de recuperación del anticuerpo monoclonal anti-antígeno HM1.24 humanizado mediante filtración			
	pH 5,5	pH 5,0	pH 4,5
0 h	98,1 %	89,6 %	87,8 %
6 h	89,3 %	91,1 %	98,6 %

5 Aunque las muestras purificadas mediante la cromatografía de afinidad de la proteína A todavía eran ricas en ADN, el experimento 1 indicó que la cantidad de ADN disminuía con la disminución del pH del orden de pH 7,5, pH 6,5 y pH 5,5, y que había una tendencia a eliminar más ADN a 0 horas que a las 6 horas. En el experimento 2, se llevó a cabo el mismo experimento en las condiciones de pH = 4,5, 5,0 y 5,5, lo que indicó que se había eliminado ADN suficiente en la misma medida, con independencia del pH y del periodo de reposo dentro del intervalo analizado. Además, el cálculo del % de recuperación indicó poca pérdida del anticuerpo monoclonal anti-antígeno HM1.24 humanizado.

Ejemplo 4: Purificación del factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF) (ejemplo de referencia)

15 Se usó una muestra que contiene G-CSF (del cultivo de células CHO; Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) para el siguiente análisis de las condiciones (punto isoeléctrico: pH 5,5 – 5,7).

4.1. Investigación de las condiciones de eliminación para el ADN residual en la fracción eluida

20 Para garantizar una eliminación eficiente de ADN residual, se investigó el pH óptimo para la filtración a través de un filtro. La muestra que contiene G-CSF se diluyó en una solución ácida de baja conductividad (HCl acuoso 2,5 mM) y se convirtió adicionalmente en solución acuosa ácida de baja conductividad usando 20 % de ácido clorhídrico, seguido de la adición del ADN de la muestra. La muestra que contiene G-CSF tratada de este modo se ajustó con una solución Tris acuosa 1,0M al siguiente nivel de pH (pH = 4,3 o 6,6) y después se filtró a través de un filtro de AC de 0,22 µm. Después se realizó un ensayo de ADN en las fracciones tanto filtrada como no filtrada. La Tabla 7 muestra los resultados del ensayo de ADN.

Tabla 7

Eliminación del ADN residual (unidad: pg/ml)		
pH para la filtración	pH 6,6	pH 4,3
Sin filtrar	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$
Filtrado	$2,8 \times 10^4$	< 90

30 Esta investigación confirma la reducción eficiente del ADN en la muestra que contiene G-CSF rica en ADN cuando la muestra se filtró a pH 4,3; es decir, la cantidad de ADN residual estaba por debajo del límite de detección del ensayo.

Ejemplo 5: Efectos de la eliminación de virus sobre la purificación de hPM-1 (anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado)

35 5.1 Material de prueba (muestra que contiene anticuerpo)

40 Las muestras que contienen el medio de cultivo (MC) de las células CHO que producen el anticuerpo hPM-1 (anticuerpo frente al receptor de IL-6 humanizado), que se habían centrifugado para eliminar las células y almacenado a -80 °C, se suplementaron con X-MuLV, Reo3 y MVM, respectivamente, seguido de filtración a través de un filtro de 0,45 µm (Bottle Top Filter, CORNING) para su uso como muestras de prueba para purificación o investigación. El anticuerpo hPM-1 se preparó como se describe en el ejemplo 1. Los virus usados para el análisis se obtuvieron cada uno de la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo).

45 5.2 Purificación mediante cromatografía en columna de rProteína

Las muestras suplementadas con virus preparadas en 5.1 se purificaron mediante cromatografía en columna de rProteína. Las condiciones detalladas son como se muestra a continuación.

50 Resina: rProteína Sepharose Fast Flow
Instrumento: AKTA explorer100, AKTApurifier
Columna: XK16/20, XK16/40

Altura de la resina: 11,5 cm

Condiciones de elución

- 5 Equilibrado: NaCl 1 mol/l, tampón C-P 20 mmol/l,
pH $7,5 \pm 0,2$, Conductividad $8,5 \pm 0,5$ S/m
Lavado 1. NaCl 1 mol/l, tampón C-P 20 mmol/l,
pH $7,5 \pm 0,2$, Conductividad $8,5 \pm 0,5$ S/m
Lavado 2. Tampón C-P 10 mmol/l,
10 pH $7,7 \pm 0,2$, Conductividad 165 ± 20 mS/m
Elución: HCl 2,5 mmol/l,
pH $2,7 \pm 0,2$, Conductividad 107 ± 10 mS/m

5.3 Tratamiento a pH bajo

- 15 Las fracciones de elución obtenidas en 5.2 se ajustaron a pH $3,2 \pm 0,1$ con 1 mol/l de ácido clorhídrico y se mantuvieron a temperatura ambiente de 15 ± 5 °C durante 30 minutos o más. Después, cada fracción de elución se ajustó a pH $7,2 \pm 0,1$ con una solución Tris 300 mmol/l, 40,0 ml de los cuales se filtró a continuación a presión de $0,03 \pm 0,01$ MPa usando una unidad de filtración equipada con un filtro de fibra de vidrio (Millipore) ($0,2 \mu\text{m}$, PALL) conectado al lado primario y un Biolnert ($0,2 \mu\text{m}$, PALL) (un soporte de filtro PALL equipado con un ajustador de $\phi 15$ mm) conectado al lado secundario.
- 20

5.4 Detección de virus

- 25 Todas las muestras recogidas se midieron mediante el ensayo de la DICT₅₀. En la prueba de capacidad de aclaramiento para X-MuLV y MVM, estos virus se detectaron no solo mediante el ensayo de DICT₅₀ que se midió mediante infectividad viral en las células de detección, sino también mediante RT/Q-PCR y Q-PCR que permitió la determinación de la cantidad de virus en fracciones.

30 5.5 Resultados

Los resultados de la detección en 5.4 se muestran en las tablas siguientes.

Tabla 8 Título del virus (ensayo de la DICT₅₀: Log₁₀/ml)

	Reo3		MVM	
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 1	Ciclo 2
Sin filtrar	5,76	5,76	4,80	4,18
Filtrado	$\leq 1,03$	$\leq 1,03$	$\leq 1,03$	$\leq 1,03$

35

Tabla 9 Título del virus (PCR: Log₁₀ Copias/5 μl)

	X-MuLV		MVM	
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 1	Ciclo 2
Sin filtrar	5,05	4,77	4,18	2,83
Filtrado	$\leq 7,90$	$\leq 1,90$	$\leq 1,30$	$\leq 1,90$

- 40 Como se ha mostrado anteriormente, el proceso de purificación de la presente invención alcanza VRL (valores de reducción logarítmica) muy altos para todos los virus analizados y este análisis confirma que los virus se eliminaban hasta un nivel inferior al límite de detección del ensato después del tratamiento a pH bajo y la filtración.

Aplicabilidad industrial

- 45 El método de la presente invención permite una eliminación eficiente de impurezas tales como contaminantes de ADN de un modo muy sencillo y es significativamente ventajoso en la purificación de anticuerpos. El método consigue una concentración de ADN extremadamente baja (por ejemplo, 22,5 pg/ml) cuando las impurezas son moléculas de ADN. El método de la presente invención también permite reducir los costes y tiene un gran significado en este campo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para eliminar virus en una muestra que contiene anticuerpos, que comprende las etapas de:
- 5 1) someter la muestra que contiene anticuerpo a una columna de cromatografía de afinidad de proteína A o G;
2) eluir la muestra con una solución acuosa ácida de conductividad baja de 0 a 50 mM;
3) ajustar la fracción eluida resultante con un tampón hasta un pH igual o menor que el punto isoeléctrico del anticuerpo, donde la molaridad de la fracción eluida ajustada es de 0 a 50 mM y
4) eliminar las partículas resultantes.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la solución acuosa ácida de baja conductividad tiene una conductividad de 0 a 30 mM, expresado en molaridad.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la solución acuosa ácida de baja conductividad tiene una conductividad de 0 a 300 mS/m.
- 20 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la solución acuosa ácida se selecciona de soluciones acuosas de ácido clorhídrico, ácido cítrico y ácido acético.
- 25 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el pH de la fracción eluida resultante se ajusta a igual o menor que el punto isoeléctrico del anticuerpo e igual o mayor que el pH de 2,0.
- 30 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la muestra que contiene el anticuerpo tiene los virus a un título de virus de 1,03 (Log₁₀/ml) o menor tras el tratamiento de la eliminación de virus.
- 35 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG.
- 40 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado.
- 45 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 8, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-antígeno HM1.24 humanizado.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 8, donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-péptido relacionado con la hormona paratiroidea humanizado (anticuerpo anti-PTHrP).
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde las partículas se eliminan mediante filtración a través de un filtro.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el tampón es una solución acuosa de Tris.
14. Un método para fabricar una formulación de anticuerpo médica, que comprende una etapa de purificación donde se usa el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.