

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 423**

51 Int. Cl.:

B01D 15/32	(2006.01)
B01D 15/14	(2006.01)
B01D 15/36	(2006.01)
C07K 1/22	(2006.01)
C07K 16/06	(2006.01)
B01D 15/38	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)
C07K 1/16	(2006.01)
C07K 1/18	(2006.01)
B01D 15/42	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2012 PCT/US2012/063242**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13067301**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2012 E 12845437 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2773438**

54 Título: **Cromatografía de sobrecarga y elución**

30 Prioridad:

02.11.2011 US 201161554898 P

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

13.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NADARAJAH, DEEPA y
MEHTA, AMIT**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 637 423 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

Cromatografía de sobrecarga y elución

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona procedimientos para purificar un producto a partir de una composición que comprende el producto y al menos un contaminante y formulaciones que comprenden el producto purificado con los procedimientos.

10

Antecedentes de la invención

15

La cromatografía de intercambio aniónico (AEX) se usa ampliamente en un modo de flujo continuo como una etapa de refinado de plataforma para anticuerpos monoclonales (MAb). Ciertos MAb que se unen a la resina AEX en condiciones normales de flujo pueden plantear retos de ajuste de la planta. Para el desarrollo clínico en etapa temprana en la que el requerimiento de masa es típicamente bajo, estos MAb no de plataforma se han purificado usando AEX o resina de modo mixto en un modo de unión y elución. Sin embargo, debido a la baja capacidad de unión dinámica (DBC) de estas resinas, la etapa tardía de implementación requeriría columnas que tienen aproximadamente 1000 l de tamaño o múltiples ciclos en una columna más pequeña limitando así el rendimiento de la planta.

20

25

La purificación de MAb se realiza típicamente usando cromatografía de unión y elución (B/E) o cromatografía de flujo continuo (F/T). Se han introducido recientemente cromatografía de reparto débil (Kelley, BD *et al.*, 2008 *Biotechnol Bioeng* 101 (3): 553-566; publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2007/0060741) y cromatografía de sobrecarga WO2011150110 sobre resinas AEX y resinas de intercambio catiónico (CEX) respectivamente para mejorar la purificación de MAb. El mecanismo general y las limitaciones de cada uno de estos modos de cromatografía se destacan a continuación.

30

Cromatografía de unión y elución: Con cromatografía B/E, el producto se carga usualmente para maximizar DBC para el material de cromatografía y luego se identifican las condiciones de lavado y elución de tal manera que se alcanza la máxima pureza del producto en el eluido. Una limitación de la cromatografía B/E es la restricción de la densidad de carga a la resina real DBC

35

Cromatografía de flujo: Usando la cromatografía F/T, las condiciones de carga se identifican cuando las impurezas se unen fuertemente al material de cromatografía mientras el producto fluye. La cromatografía F/T permite una alta densidad de carga para MAb convencionales pero no puede ser implementable para MAb sin plataforma o las condiciones de solución que permiten el funcionamiento F/T para estos MAb sin plataforma pueden ser tales que no son implementables en plantas de producción existentes.

40

Cromatografía de reparto débil: Este modo de funcionamiento mejora el modo F/T identificando condiciones de solución en las que hay una unión débil de MAb a la resina (2 a 20 g/l). En estas condiciones, las impurezas se unen más fuerte que en el modo F/T y se obtiene así una purificación mejorada. Sin embargo, las condiciones de carga se dirigen a tener un bajo coeficiente de reparto del producto (K_p) en el intervalo de 0,1-20.

45

Cromatografía de sobrecarga: En este modo de cromatografía, el producto de interés se carga más allá de la capacidad de unión dinámica del material de cromatografía para el producto, por lo que se denomina sobrecarga. Se ha demostrado que el modo de funcionamiento proporciona la purificación de MAb con medios de intercambio catiónico (CEX) y particularmente con membranas. Sin embargo, una limitación de este enfoque es que podría haber rendimientos bajos con resina ya que no hay fase de elución.

50

La purificación a gran escala y rentable de un polipéptido hasta una pureza suficiente para su uso como un agente terapéutico humano sigue siendo un desafío formidable.

55

Todas las referencias citadas en el presente documento, incluidas solicitudes de patente y publicaciones, se incorporan como referencia en su totalidad. El documento WO2012068134A1 se refiere al enriquecimiento y concentración de determinadas isoformas del producto por unión con sobrecarga y cromatografía de elución. El documento WO2006116064A2 se refiere a un aparato y a procedimientos para la purificación dirigida por espectrometría de masas de biopolímeros. Liu, HF *et al.*, 2011 *J Chrom A* 1218(39):6943-6952 se refiere a la exploración de la cromatografía de intercambio catiónico con sobrecarga para la purificación de anticuerpos monoclonales. El documento WO9508574A1 se refiere al procedimiento de cromatografía de desplazamiento y producto de hemoglobina purificada. El documento WO2011035282A1 se refiere a la separación por captura doble. El documento US2011065901A1 se refiere a procedimientos para purificar una proteína diana a partir de una o más impurezas en una muestra.

60

Breve resumen

65

La invención proporciona procedimientos para purificar un polipéptido a partir de una composición que comprende el polipéptido y uno o más contaminantes, comprendiendo dicho procedimiento a) cargar la composición en un modo

5 mixto, un intercambio aniónico, una interacción hidrófoba o un material de cromatografía de afinidad a 20 veces la capacidad de unión dinámica del material de cromatografía para el polipéptido usando un tampón de carga, en donde el coeficiente de reparto del material de cromatografía para el polipéptido es mayor que 30, b) eluyendo el polipéptido del material de cromatografía en condiciones en las que el uno o más contaminantes permanecen unidos al material de cromatografía utilizando un tampón de elución, en el que el tampón de elución tiene una conductividad menor que la conductividad del tampón de carga y c) agrupación de fracciones que comprenden el polipéptido en el efluente de cromatografía de las etapas a) y b).

10 En algunos modos de realización, el polipéptido es un anticuerpo o inmunoadhesina. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal; por ejemplo, pero sin limitarse a un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano.

15 En algunos modos de realización, el anticuerpo es un fragmento de unión al antígeno; por ejemplo pero sin limitarse a estos, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un scFv, un di-scFv, un bi-scFv, un tándem (di, tri)-scFv, un Fv, un sdAb, un anticuerpo trifuncional, un BiTE, un diacuerpo y un triacuerpo.

En algunos modos de realización, el polipéptido es una enzima, una hormona, una proteína de fusión, una proteína que contiene Fc, un inmunoconjugado, una citocina o una interleucina.

20 En algunos modos de realización, el polipéptido se purifica a partir de una composición que comprende uno o más contaminantes; por ejemplo, la proteína de ovario de hámster chino (CHOP), una proteína de célula huésped (HCP), proteína A lixiviada, carboxipeptidasa B, ácido nucleico, ADN, variantes de producto, proteína agregada, componente de medio de cultivo celular, gentamicina, fragmentos polipeptídicos, endotoxinas y contaminante viral.

25 En algunos modos de realización de la invención, el material de cromatografía se selecciona de un material de modo mixto, un material de intercambio aniónico, un material de interacción hidrofóbico y un material de afinidad.

En algunos modos de realización, la composición se carga sobre el material de cromatografía a aproximadamente las capacidades de unión dinámica de los materiales de cromatografía para el o los varios contaminantes.

30 En algunos modos de realización, el coeficiente de reparto del material de cromatografía para el polipéptido es mayor que 30 o mayor que 100

35 En algunos modos de realización, los procedimientos proporcionan OEC en el que el tampón de elución tiene una conductividad menor que la conductividad del tampón de carga. En otros modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad mayor que la conductividad del tampón de carga. En algunos modos de realización, los procedimientos proporcionan OEC en donde el tampón de elución tiene un pH menor que el pH del tampón de carga. En otros modos de realización, el tampón de elución tiene un pH mayor que el pH del tampón de carga.

40 En algunos modos de realización, el polipéptido de los procedimientos está en un eluyente de una cromatografía de afinidad, una cromatografía de intercambio catiónico, una cromatografía de intercambio aniónico, una cromatografía de modo mixto y una cromatografía de interacción hidrófoba. En algunos modos de realización, el polipéptido está en un eluyente de una cromatografía de Proteína A.

45 En algunos modos de realización, el polipéptido de los procedimientos se purifica adicionalmente; por ejemplo, por filtración de virus, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía en modo mixto y/o cromatografía de interacción hidrófoba. En algunos modos de realización, el polipéptido se concentra adicionalmente; por ejemplo por ultrafiltración, diafiltración o una combinación de ultrafiltración y diafiltración. En algunos modos de realización, el polipéptido de los procedimientos se combina adicionalmente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 **Breve descripción de los dibujos**

55 La figura 1 muestra resultados de cribado de alto rendimiento (HTS) sobre la resina Cpto Adhere en condiciones de unión por lotes para MAb3. La figura 1A muestra contornos de valores constantes de K_p para MAb3. La figura 1B muestra la capacidad de unión real del MAb 3 en el sobrenadante a 80 g/l de exposición del producto a la resina. La figura 1C muestra la capacidad de unión real de la impureza (proteína de la célula huésped) en el sobrenadante a 80 g/l de exposición de producto a la resina. Todas las gráficas de contorno se generaron usando un modelo de superficie de respuesta derivado de los datos brutos.

60 La figura 2 muestra un cromatograma para un modo de funcionamiento OEC optimizado. El MAb 3 se usó para este ensayo con una densidad de carga de 180 g/l.

La figura 3 muestra la optimización de carga para un modo OEC usando MAb 3.

La figura 4 muestra un cromatograma con condiciones de carga objetivo para un modo de funcionamiento OEC. Condiciones similares de carga y elución dan lugar a la cola y, por lo tanto, un aumento del 45 % en el volumen de la piscina. El MAb 3 se usó para este ensayo con una densidad de carga de 180 g/l.

5 La figura 5 muestra la optimización de la elución para el modo OEC usando MAb3.

La figura 6 muestra el análisis de impurezas en fracciones y el análisis acumulativo de impurezas.

10 La figura 7 muestra el análisis de avance de MAb 3 CHOP de la resina Capto Adhere en el modo OEC a una densidad de carga de 1000 g/l.

La figura 8 muestra el análisis del rendimiento en prácticas a escala piloto en un amplio intervalo de densidades de carga de 70 g/l a 180 g/l.

15 La figura 9 muestra una comparación del modo de funcionamiento de la cromatografía de repato débil y el modo de funcionamiento de la cromatografía de sobrecarga y elución. El producto era MAb3 y el material de cromatografía era una resina Capto Adhere.

20 La figura 10 muestra el análisis de MAb 3 CHOP en resina QMA bajo el modo de funcionamiento OEC a una densidad de carga de 150 g/l.

La figura 11 muestra el análisis MAb 4 CHOP en resina Capto Adhere en el modo de funcionamiento OEC a una densidad de carga de 150 g/l.

25 La figura 12 muestra el análisis MAb 4 CHOP en resina Capto MMC en el modo de funcionamiento OEC con una densidad de carga de 150 g/l.

30 La figura 13 muestra el análisis de avance de MAb 3 CHOP en la resina Capto Adhere en el modo OEC a una densidad de carga de 200 g/l. Se cargó un conjunto de MAb3 proteína A en resina de Capto Adhere a 200 g/l (que está más allá de su capacidad de unión al producto de 50 g/l). El análisis de avance de CHOP demostró que la CHOP no avanzaba hasta el procesamiento a 200 g/l de MAb.

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

35 El término «producto» como se describe en el presente documento es la sustancia a purificar por OEC; por ejemplo, un polipéptido.

40 El término «polipéptido» o «proteína se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido no por aminoácidos. Los términos incluyen también un polímero de aminoácidos que ha sido modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los términos «polipéptido» y «proteína» como se usan aquí, incluyen específicamente anticuerpos.

50 El polipéptido «purificado» (por ejemplo, anticuerpo o inmunoadhesina) significa que el polipéptido se ha incrementado en pureza, de tal manera que existe en una forma más pura que en su entorno natural y/o cuando inicialmente se sintetiza y/o se amplifica en condiciones de laboratorio. La pureza es un término relativo y no significa necesariamente pureza absoluta.

55 El término «epítipo marcado» cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido fusionado con un «polipéptido marcador». El polipéptido marcador tiene suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el que puede hacerse un anticuerpo, pero es suficientemente corto para que no interfiera con la actividad del polipéptido al que está fusionado. El polipéptido marcador preferentemente también es bastante único de manera que el anticuerpo no reacciona de forma cruzada sustancialmente con otros epítipos. Los polipéptidos marcados adecuados generalmente tienen al menos seis residuos de aminoácidos y usualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

65 «Activo» o «actividad» para los propósitos en el presente documento se refiere a la forma o formas de un polipéptido que retienen una actividad biológica y/o inmunológica de un polipéptido nativo o de origen natural, en el que la actividad «biológica» se refiere a una función biológica (bien inhibidora o estimuladora) causada por un polipéptido nativo o natural que no sea la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítipo antigénico poseído por un

polipéptido nativo o de origen natural y una actividad «inmunológica» se refiere a la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un polipéptido nativo o de origen natural.

5 El término «antagonista» se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o totalmente una actividad biológica de un polipéptido nativo. De una manera similar, el término «agonista» se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica de un polipéptido nativo. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos agonistas o antagonistas o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos nativos, etc. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido pueden comprender poner en contacto un polipéptido con una molécula de agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido.

15 «Citotoxicidad dependiente del complemento» o «CDC» se refiere a la capacidad de una molécula para efectuar la lisis de una diana en presencia del complemento. La vía de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo)) complejado con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo CDC, por ejemplo, según se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

20 Un polipéptido «que se une a» un antígeno de interés, por ejemplo, una diana polipéptido-antígeno asociada a tumor, es uno que se une al antígeno con suficiente afinidad, tal que el polipéptido es útil como un agente diagnóstico y/o terapéutico en el direccionamiento de una célula o tejido que expresa el antígeno, y no reacciona significativamente de forma cruzada con otros polipéptidos. En dichos modos de realización, el grado de unión del polipéptido a un polipéptido "no diana" será inferior a aproximadamente un 10 % de la unión del polipéptido a su polipéptido diana particular, determinado mediante análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA).

30 Con respecto a la unión de un polipéptido a una molécula diana, el término «unión específica a» o «se une específicamente a» o «es específico para» un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido diana particular significa que la unión es cuantificablemente diferente de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante competición con una molécula de control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, la unión específica se indica si la unión de la diana marcada a una sonda se inhibe competitivamente con un exceso de diana no marcada.

35 El término «anticuerpo» en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpo, siempre que muestren la actividad biológica deseada. El término «inmunoglobulina» (Ig) se utiliza intercambiable con el anticuerpo del presente documento.

40 Los anticuerpos son moléculas de inmunoglobulina de origen natural que tienen estructuras variables, todas basadas en el pliegue de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos IgG tienen dos cadenas «pesadas» y dos cadenas «ligeras» que están unidas por puentes disulfuro para formar un anticuerpo funcional. Cada cadena pesada y ligera comprende una región «constante» (C) y una región «variable» (V). Las regiones V determinan la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo, mientras que las regiones C proporcionan soporte estructural y función en interacciones no específicas de antígeno con efectores inmunes. La especificidad de unión al antígeno de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo es la capacidad de un anticuerpo para unirse específicamente a un antígeno particular.

50 La especificidad de unión al antígeno de un anticuerpo se determina por las características estructurales de la región V. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente entre los 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominados regiones estructurales (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas «regiones hipervariables» que tienen cada una 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por medio de las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

65 Cada región V comprende típicamente tres regiones determinantes de complementariedad («CDR», cada una de las cuales contiene un «bucle hipervariable»), y cuatro regiones estructurales. Un sitio de unión de anticuerpo, la unidad estructural mínima requerida para unirse con afinidad sustancial a un antígeno deseado particular, por lo tanto, incluirá

típicamente las tres CDR, y al menos tres, preferentemente cuatro regiones de armazón entremezcladas entre ellas para mantener y presentar las CDR en la conformación apropiada. Los anticuerpos clásicos de cuatro cadenas tienen sitios de unión al antígeno que están definidos por los dominios V_H y V_L en cooperación. Ciertos anticuerpos, tales como anticuerpos de camello y tiburón, carecen de cadenas ligeras y dependen de sitios de unión formados únicamente por cadenas pesadas. Pueden prepararse inmunoglobulinas dirigidas de dominio único en las que los sitios de unión se forman por cadenas pesadas o cadenas ligeras solas, en ausencia de cooperación entre V_H y V_L .

El término «variable» se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables, tanto en la cadena ligera como en los dominios variables de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman las regiones estructurales (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por medio de las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término «región hipervariable», cuando se usa en el presente documento, se refiere a los restos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende generalmente residuos de aminoácidos de una «región determinante de complementariedad» o «CDR» (por ejemplo, alrededor de aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el V_L y alrededor de aproximadamente los residuos 31-35B (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del V_H (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un «bucle hipervariable» (por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio V_L y los residuos 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio V_H ; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).

Los restos «estructurales» o «FR» son los restos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable, como se define en el presente documento.

Los «fragmentos de anticuerpo» comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión al antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; diacuerpos tándem (taDb), anticuerpos lineales (por ejemplo, Patente de EEUU n.º 5.641.870, ejemplo 2, Zapata et al., *Protein Eng.* 8 (10): 1057-1062 (1995)); anticuerpos de un solo brazo, anticuerpos de dominio variable único, minicuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, incluyendo pero sin limitarse a, Db-Fc, taDb-Fc, taDb-CH3, (scFV)₄-Fc, di-scFv, bi-scFv o (di,tri)-scFv) tándem; y acopladores de células T biespecíficos (BiTE).

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, llamados fragmentos «Fab», cada uno con un sitio de unión al antígeno único, y un fragmento «Fc» residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de unión al antígeno y es todavía capaz de reticular el antígeno.

Un fragmento «Fv» es un fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a y reconocimiento de antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio de región variable de una cadena pesada y una cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H - V_L . Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a menudo con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el o los residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las «cadena ligeras» de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie vertebrada se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) and lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

5 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas se pueden dividir, además, en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes
10 clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Los fragmentos de anticuerpos «Fv monocatenario» o «scFv» comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En algunos modos de realización el polipéptido de Fv comprende adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L , que posibilita que scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de los scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).
15

El término «diacuerpos» se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica ($V_H - V_L$). Al usar un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más en detalle, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161 y en Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)).
20

El término «anticuerpo multiespecífico» se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente un anticuerpo que tiene especificidad poliepitópica. Dichos anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L), donde la unidad $V_H V_L$ tiene especificidad poliepitópica, anticuerpos que tienen dos o más dominios V_L y V_H con cada unidad $V_H V_L$ que se une a un epítipo diferente, anticuerpos que tienen dos o más dominios variables únicos con cada dominio variable único que se une a un epítipo diferente, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fv, DsFv, scFv, diacuerpos, diacuerpos biespecíficos, triacuerpos, anticuerpos trifuncionales, fragmentos de anticuerpos que se han unido covalentemente o no covalentemente. «Especificidad poliepitópica» se refiere a la capacidad de unirse específicamente a dos o más epítopos diferentes de la misma diana o de diferentes dianas. «Monoespecífico» se refiere a la capacidad de unirse sólo a un epítipo. De acuerdo con un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo de IgG1 que se une a cada epítipo con una afinidad de 5 μM a 0,001 pM, de 3 μM a 0,001 pM, de 1 μM a 0,001 pM, de 0,5 μM a 0,001 pM o de 0,1 μM a 0,001 pM.
25

La expresión «anticuerpos de dominio único» (sdAb) o «anticuerpos de dominio variable único (SVD)» se refiere generalmente a anticuerpos en los que un único dominio variable (V_H o V_L) puede conferir unión a antígeno. En otras palabras, el dominio variable único no necesita interactuar con otro dominio variable para reconocer el antígeno diana. Ejemplos de anticuerpos de dominio único incluyen los derivados de camélidos (lamas y camellos) y peces cartilaginosos (por ejemplo, tiburones nodriza) y los derivados de procedimientos recombinantes de anticuerpos de humanos y de ratón (*Nature* (1989) 341:544-546; *Dev Comp Immunol Trends Biochem Sci* (2001) 26:230-235, *Trends Biotechnol* (2003): 21:484-490, WO 2005/035572, WO 03/035694, *Febs Lett* (1994) 339:285-290; WO 00/29004, WO 02/051870).
30

El término «anticuerpo monoclonal» como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, a excepción de posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes dichas variantes, en general, en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos al no estar contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador «monoclonal» indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con los procedimientos proporcionados en la presente invención se pueden preparar por el procedimiento de hibridoma descrito inicialmente por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden preparar por procedimientos de ADN recombinante (véase, p.ej., la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Los «anticuerpos monoclonales» también se pueden aislar de colecciones de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), por ejemplo.
35

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) «quiméricos» en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de
40

5 anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es(son) idéntica(s) u homóloga(s) a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos «primatizados» que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, tales como babuino, macaco de la India o macaco de Java) y secuencias de regiones constantes humanas (patente de EE. UU n.º 5.693.780).

10 Las formas «humanizadas» de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables se corresponden con las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, a excepción de la(s) sustitución(es) de FR señaladas anteriormente. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

25 Para los propósitos de la presente invención, un «anticuerpo intacto» es uno que comprende dominios variables pesados y ligeros así como una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

30 Los «anticuerpos nativos» son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tienen puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada.

40 Un «anticuerpo desnudo» es un anticuerpo (como se define en el presente documento) que no está conjugado a una molécula heteróloga, tal como un resto citotóxico, polímero o radiomarcador.

45 En algunos modos de realización, las «funciones efectoras» del anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, o que varían con el isotipo de anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo incluyen: la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente del complemento; la unión al receptor Fc; la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); la fagocitosis; la regulación a la baja de receptores de superficie celular.

50 «Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos» y «ADCC» se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células citolíticas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citolíticas naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998).

60 Las «células efectoras humanas» son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En algunos modos de realización, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células citolíticas naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; siendo preferentes las PBMC y las células NK.

Los términos «receptor Fc» o «FcR» se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunos modos de realización, el FcR es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferente es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas empalmadas alternativamente de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un «receptor de activación») y FcγRIIB (un «receptor de inhibición»), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están cubiertos por el término «FcR» del presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

El término «secuencial» como se usa en el presente documento con respecto a la cromatografía se refiere a que presenta una primera cromatografía seguida por una segunda cromatografía. Pueden incluirse etapas adicionales entre la primera cromatografía y la segunda cromatografía.

El término «continuo» como se usa en el presente documento con respecto a la cromatografía se refiere a que presenta un primer material de cromatografía y un segundo material de cromatografía directamente conectado o algún otro mecanismo que permita un flujo continuo entre los dos materiales de cromatografía.

«Contaminantes» se refieren a materiales que son diferentes del producto polipeptídico deseado. El contaminante incluye, sin limitación: materiales de la célula huésped, tales como CHOP; proteína A lixiviada; ácido nucleico; una variante, fragmento, agregado o derivado del polipéptido deseado; otro polipéptido; endotoxina; contaminante viral; el componente de medio de cultivo de células, etc. En algunos ejemplos, el contaminante puede ser una proteína de célula huésped (HCP), por ejemplo, pero no limitada a, una célula bacteriana tal como una célula de *E. coli*, una célula de insecto, una célula procariota, una célula eucariota, una célula de levadura, una célula de mamífero, una célula aviar, una célula fúngica.

La «capacidad de unión dinámica» de un material de cromatografía es la cantidad de producto, por ejemplo, polipéptido, el material se unirá en condiciones de flujo real antes de que se produzca una ruptura significativa del producto no unido.

El «coeficiente de reparto», K_p , tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la concentración molar del producto, por ejemplo, polipéptido, en la fase estacionaria dividida por la concentración molar del producto en la fase móvil.

«Densidad de carga» se refiere a la cantidad, por ejemplo, gramos, de composición puesta en contacto con un volumen de material de cromatografía, por ejemplo, litros. En algunos ejemplos, la densidad de carga se expresa en g/l.

La referencia a «aproximadamente» de un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) variaciones que están dirigidas a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a «aproximadamente X» incluye la descripción de «X».

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares «un», «una», «el» y «ella» incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se entiende que los aspectos y variaciones de la invención descritos en el presente documento incluyen aspectos y variaciones «consistentes» y/o «que consisten esencialmente en».

II Métodos de purificación

Se proporcionan en el presente documento procedimientos para purificar un producto, tal como un polipéptido, a partir de una composición que comprende el producto y al menos un contaminante usando cromatografía de sobrecarga y elución (OEC). OEC proporciona un modo de funcionamiento en el que las ventajas proporcionadas por diferentes modos de cromatografía se realizan en un modo de cromatografía única. OEC se puede implementar en múltiples resinas, a la vez que proporciona una mayor eliminación de impurezas y ventajas significativas de producción, como columnas más pequeñas, mejor ajuste de planta y menor costo. El modo de funcionamiento con OEC puede dividirse en tres componentes diferentes.

1. Sobrecarga – La composición se carga sobre el material de cromatografía tal que el producto, por ejemplo, un polipéptido, se carga sobre el material de cromatografía en una cantidad que excede la capacidad de unión dinámica (DBC) del material para el producto. En algunos modos de realización, se determinan condiciones de carga, tales como pH y conductividad, donde las impurezas se unen fuertemente al material de cromatografía. En algunos modos de

realización, las condiciones de cromatografía se eligen de tal manera que, incluso si el producto penetra después de unirse, la mayor parte de las impurezas, si no todas, no lo hacen. En algunos modos de realización la composición se carga en o cerca del DBC del material para uno o más contaminantes. El modo de sobrecarga permite utilizar el material de cromatografía más allá del DBC típico del material para el producto.

2. Agrupación – La agrupación del producto, por ejemplo, un polipéptido, en el eluyente comienza en la penetración del producto. Puesto que las condiciones de carga son tales que las impurezas continúan uniéndose durante la fase de penetración, se puede obtener una reserva de producto limpia en el eluyente durante la fase de carga de la cromatografía.

3. Elución – Una vez completada la carga de la composición sobre el material de cromatografía, el producto, por ejemplo, polipéptido, se eluye del material de cromatografía usando condiciones de elución que se identifican de tal manera que el producto unido se eluye mientras que la mayoría de las impurezas permanecen unidas al material de cromatografía.

En algunos aspectos, OEC incrementa la utilización de material de cromatografía significativamente más allá del DBC del material para el producto, proporcionando así una ventaja en comparación con otros procedimientos de cromatografía. Por ejemplo, una utilización del material de cromatografía 10 veces más alta puede dar como resultado un coste significativamente menor.

A diferencia de la cromatografía de unión y elución tradicional en la que la carga del material de cromatografía se optimiza para maximizar la unión al producto, por ejemplo, polipéptido, para la resina de cromatografía, con condiciones de carga de OEC, puede optimizarse para maximizar la unión de contaminantes al material de cromatografía y no la unión del producto al material de cromatografía. En algunos aspectos, la composición se carga sobre un material de cromatografía en una cantidad que excede la capacidad de unión dinámica del material de cromatografía para el producto. En el proceso de carga del material de cromatografía, parte del producto se arrastrará en el lavado y parte del producto permanecerá unido al material de cromatografía. Una vez completada la carga, el producto restante unido al material de cromatografía se puede eluir del material de cromatografía. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía es una columna de cromatografía. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía es una membrana cromatográfica.

En algunos aspectos de la invención, se carga una composición sobre un material de cromatografía a aproximadamente la capacidad de unión dinámica del material de cromatografía para uno o más de los contaminantes en la composición. En algunos modos de realización, se carga una composición sobre un material de cromatografía en una cantidad que excede la capacidad de unión del material de cromatografía para el producto. En algunos modos de realización, se carga una composición sobre un material de cromatografía a aproximadamente la capacidad de unión dinámica del material de cromatografía para uno o más de los contaminantes y se supera la capacidad de unión del material de cromatografía para el producto. En algunos modos de realización, la composición se carga sobre el material de cromatografía a 20 veces el DBC del material de cromatografía para el producto. En algunos modos de realización, la composición se carga sobre el material de cromatografía a 100 veces el DBC del material de cromatografía para el producto. En algunos modos de realización, la composición se carga sobre un material de cromatografía a aproximadamente la capacidad de unión dinámica del material de cromatografía para todos los contaminantes en la composición. En algunos modos de realización, se carga una composición sobre un material de cromatografía a aproximadamente la capacidad de unión dinámica del material de cromatografía para todos los contaminantes y superando la capacidad de unión del material de cromatografía para el producto. En algunos modos de realización, se carga una composición sobre un material de cromatografía a menos de la capacidad de unión dinámica del material de cromatografía para todos los contaminantes y superando la capacidad de unión del material de cromatografía para el producto. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía está en una columna de cromatografía. En algunos modos de realización, la columna de cromatografía es una columna de cromatografía a escala industrial. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía es una membrana cromatográfica.

La capacidad de unión dinámica de un material de cromatografía para un producto y para uno o más contaminantes se puede estimar determinando el coeficiente de reparto (K_p) para el producto o contaminantes en función del pH y la concentración de contraión para un material de cromatografía particular. Por ejemplo, la capacidad de unión dinámica de un material de cromatografía, por ejemplo, una resina en modo mixto, se puede determinar para un polipéptido. Las capacidades de unión reales de un material de cromatografía para un producto o contaminante en una combinación específica de pH y concentración de contraión se pueden determinar desafiando la unión con un exceso del producto y/o contaminante.

En algunos modos de realización, la OEC se lleva a cabo cuando el K_p del producto, por ejemplo, polipéptido, es mayor que aproximadamente 30. En algunos modos de realización, la OEC se lleva a cabo cuando el K_p del producto es mayor que aproximadamente 50. En algunos modos de realización, la OEC se lleva a cabo cuando el K_p del producto es mayor que aproximadamente 75. En algunos modos de realización, la OEC se lleva a cabo cuando el K_p del producto es mayor que aproximadamente 100.

Las condiciones para OEC de una composición particular que comprende un producto, tal como un polipéptido, y un contaminante pueden determinarse midiendo el K_p y la capacidad de unión dinámica de un material cromatográfico particular a diferentes pH y concentración de contraíón. Se puede llevar a cabo un cribado de alto rendimiento para determinar las condiciones de la OEC en las que la unión de contaminantes es alta y donde el producto puede eluirse sin eluir la mayor parte, si no todos, los contaminantes. Por ejemplo, la composición se puede incubar con un material de cromatografía en tampón a varios pH y concentraciones de contraíón bajo un sistema de alto rendimiento; por ejemplo, en pocillos de una placa de pocillos múltiples. Después de un período de incubación, el sobrenadante se separa del material de cromatografía y se determina la cantidad de producto o contaminante en el sobrenadante. En algunos modos de realización, se usan concentraciones bajas de composición para determinar K_p . En algunos modos de realización, se utilizan altas concentraciones de la composición para determinar las capacidades de unión dinámicas.

Además de proporcionar información sobre K_p y la capacidad de unión dinámica de un material de cromatografía para productos y contaminantes particulares, el cribado de alto rendimiento proporciona una guía para condiciones de carga y elución en términos de pH y concentración de contraíón. Por ejemplo, en algunos modos de realización, el tampón de carga se selecciona mediante un cribado de alto rendimiento para un pH y concentración de contraíón para maximizar la unión del contaminante al material de cromatografía, pero también para maximizar la cantidad de producto, por ejemplo, polipéptido, en el eluyente mientras se minimiza la cantidad de contaminante, por ejemplo, proteína de la célula huésped, en el eluyente. En algunos modos de realización, la composición se carga sobre un material de cromatografía a un pH y conductividad determinados mediante cribado de alto rendimiento en el que aproximadamente todos los contaminantes en la composición se unen al material de cromatografía. En algunos modos de realización, el producto se eluye del material de cromatografía a un pH y una conductividad determinados mediante un cribado de alto rendimiento, en el que aproximadamente todo el producto eluye del material de cromatografía y todos los contaminantes permanecen unidos al material de cromatografía.

En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para identificar las condiciones operativas (por ejemplo, utilizando técnicas de cribado de alto rendimiento) que hacen que el material de cromatografía se una a una cantidad máxima de contaminantes con independencia de la cantidad de producto unido por ml de material de cromatografía. La etapa de cribado se utiliza para identificar las condiciones de elución de tal manera que el producto unido eluye del material de cromatografía y las impurezas permanecen estrechamente unidas al material de cromatografía.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de cromatografía es un material de modo mixto que comprende grupos funcionales capaces de una o más de las siguientes funcionalidades: intercambio aniónico, intercambio catiónico, enlace de hidrógeno e interacciones hidrófobas. En algunos modos de realización, el material de modo mixto comprende grupos funcionales capaces de intercambio aniónico e interacciones hidrófobas. El material de modo mixto puede contener N-bencil-N-metiletanolamina, 4-mercapto-etil-piridina, hexilamina o fenilpropilamina como ligando o contener polialilamina reticulada. Ejemplos de los materiales de modo mixto incluyen resina Cpto Adhere, resina QMA, resina Cpto MMC, resina MEP HyperCel, resina HEA HyperCel, resina PPA HyperCel o membrana ChromaSorb o Sartobind STIC. En algunos modos de realización, el material de modo mixto es la resina Cpto Adhere. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de modo mixto es una columna de cromatografía de modo mixto. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de modo mixto es una membrana de modo mixto.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria, el material de cromatografía es un material de cromatografía de intercambio iónico; por ejemplo, un material de cromatografía de intercambio aniónico o un material de cromatografía de intercambio catiónico. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria, el material de cromatografía es un material de intercambio aniónico. En algunos modos de realización, el material de cromatografía de intercambio aniónico es una fase sólida que está cargada positivamente y tiene aniones libres para el intercambio con aniones en una solución acuosa pasaba por o a través de la fase sólida. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria, el material de intercambio aniónico puede ser una membrana, un monolito o resina. En un modo de realización, el material de intercambio aniónico puede ser una resina. En algunos modos de realización, el material de intercambio aniónico puede comprender una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria o un grupo funcional de ion amonio cuaternario, un grupo funcional poliamina o un grupo funcional dietilaminoetilo. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio aniónico es una columna de cromatografía de intercambio aniónico. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio aniónico es una membrana de cromatografía de intercambio aniónico.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de cromatografía es un material de intercambio catiónico. En algunos modos de realización, el material de intercambio catiónico es una fase sólida que está cargada negativamente y tiene cationes libres para el intercambio con cationes en una solución acuosa que pasa por o a través de la fase sólida. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio catiónico puede ser una membrana, un monolito o resina. En algunos modos de realización, el material de intercambio catiónico puede ser una resina. El material de intercambio catiónico puede comprender un grupo funcional ácido carboxílico o un grupo funcional ácido sulfónico tal como, pero sin limitarse a, sulfonato, carboxílico, ácido carboximetilsulfónico, sulfoisobutilo, sulfoetilo,

5 carboxilo, sulfopropilo, sulfonilo, sulfoxietilo u ortofosfato. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio catiónico es una columna de cromatografía de intercambio catiónico. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio catiónico es una membrana de cromatografía de intercambio catiónico. En algunos modos de realización de la invención, el material de cromatografía no es un material de cromatografía de intercambio catiónico.

10 En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio iónico puede utilizar un material de cromatografía convencional o un material de cromatografía convectivo. Los materiales de cromatografía convencionales incluyen, por ejemplo, materiales perfusivos (por ejemplo, resina de poli(estireno-divinilbenceno) y materiales difusivos (por ejemplo, resina de agarosa reticulada). En algunos modos de realización, la resina de poli(estireno-divinilbenceno) puede ser resina Poros. En algunos modos de realización, la resina de agarosa reticulada puede ser resina sulfopropil-Sepharose Fast Flow («SPSFF»). El material de cromatografía convectiva puede ser un material de membrana (por ejemplo, polietersulfona) o monolítico (por ejemplo, polímero reticulado). La membrana de polietersulfona puede ser Mustang. El material monolítico de polímero reticulado puede ser poli(metacrilato de glicidilo-co-dimetacrilato de etileno) reticulado.

Ejemplos de materiales de intercambio aniónico son conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, Poros HQ 50, Poros PI 50, Poros D, Mustang Q, Q Sepharose FF y DEAE Sepharose.

20 Ejemplos de materiales de intercambio catiónico son conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, Mustang S, Sartobind S, S03 Monolith, S. Ceramic HyperD, Poros XS, Poros HS50, Poros HS20, SPSFF, SP-Sepharose XL (SPXL), CM Sepharose Fast Flow, Capto S, Fractogel Se HiCap, Fractogel S03 o Fractogel COO. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio catiónico es Poros HS50. En algunos modos de realización, la resina Poros HS puede ser partículas Poros HS 50 µm o Poros HS 20 µm.

30 En algunos aspectos de la invención, el material de cromatografía es un material de cromatografía de interacción hidrófoba. La cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) es una técnica de cromatografía líquida que separa las biomoléculas según la hidrofobicidad. Ejemplos de materiales de cromatografía HIC incluyen, pero no se limitan a, Toyopearl hexil 650, Toyopearl butyl 650, Toyopearl phenyl 650, Toyopearl ether 650, Source, Resource, Sepharose Hi-Trap, Octyl sepharose, Phenyl sepharose. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía HIC es una columna de cromatografía HIC. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía HIC es una membrana de cromatografía HIC.

35 En algunos aspectos de la invención, el material de cromatografía es un material de cromatografía de hidroxiapatita (HAP). Ejemplos de material de cromatografía de hidroxiapatita incluyen pero están limitados a HA Ultrogel, y hidroxiapatita CHT. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía HAP es una columna de cromatografía HAP. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía HAP es una membrana de cromatografía HAP.

40 En algunos aspectos de la invención, el material de cromatografía es un material de cromatografía de afinidad. Ejemplos de materiales de cromatografía de afinidad incluyen, pero no se limitan a materiales de cromatografía derivatizados con proteína A o proteína G. Ejemplos de material de cromatografía de afinidad incluyen, pero no se limitan a, Prosep-VA, Prosep-VA Ultra Plus, Proteína A sepharose fast flow, Toyopearl Protein A, MAbSelect, MAbSelect SuRe y MAbSelect SuRe LX. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de afinidad es una columna de cromatografía de afinidad. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de afinidad es una membrana de cromatografía de afinidad.

50 La carga de la composición sobre el material de cromatografía puede optimizarse para la separación del producto de los contaminantes por OEC. En algunos modos de realización, el producto es un polipéptido. En algunos modos de realización, la carga sobre la composición sobre el material de cromatografía se optimiza para la unión de los contaminantes al material de cromatografía. Por ejemplo, la composición puede cargarse sobre el material de cromatografía, por ejemplo, una columna de cromatografía, en un tampón de carga a una pluralidad de pH diferentes mientras que la conductividad del tampón de carga es constante. De forma alternativa, la composición puede cargarse sobre el material de cromatografía en un tampón de carga en un número de conductividades diferentes mientras que el pH del tampón de carga es constante. Una vez completada la carga de la composición sobre el material de cromatografía y la elución del producto del material de cromatografía en una fracción de la piscina, la agrupación, la cantidad de contaminante en la fracción de la agrupación proporciona información relativa a la separación del producto de los contaminantes para un pH o conductividad dado. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la composición se carga sobre un material de cromatografía a una densidad de carga del polipéptido de más de aproximadamente cualquiera de 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l, 130 g/l, 140 g/l, 150 g/l, 160 g/l, 200 g/l, 300 g/l, 400 g/l, 500 g/l, 550 g/l, 600 g/l, 650 g/l, 700 g/l, 800 g/l, 900 g/l, 1000 g/l, 2000 g/l o 5000 g/l del material de cromatografía. En algunos modos de realización, la composición se carga sobre un material de cromatografía a una densidad de carga del polipéptido de aproximadamente cualquiera de 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l, 130 g/l, 140 g/l, 150 g/l, 160 g/l, 170 g/l, 180 g/l, 200 g/l, 200 g/l, 300 g/l, 400 g/l, 500 g/l, 550 g/l, 600 g/l, 650 g/l, 700 g/l, 800 g/l, 900 g/l,

1000 g/l o 2000 g/l del material de cromatografía. La composición puede cargarse en un material de cromatografía a una densidad de carga del polipéptido de entre aproximadamente cualquiera de 30 g/l y 2000 g/l, 30 g/l y 1000 g/l, 30 g/l y 200 g/l, 30 g/l y 180 g/l, 50 g/l y 2000 g/l, 50 g/l y 1000 g/l, 50 g/l y 200 g/l, 50 g/l y 180 g/l, 150 g/l y 1500 g/l, 150 g/l y 1000 g/l, 200 g/l y 1000 g/l, 200 g/l y 1500 g/l, 300 g/l y 1500 g/l, 400 g/l y 1000 g/l, o 500 g/l y 1000 g/l de material de cromatografía.

5

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la composición se carga sobre un material de cromatografía de modo mixto a una densidad de carga del polipéptido de más de aproximadamente cualquiera de 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l, 130 g/l, 140 g/l, 150 g/l, 160 g/l, 170 g/l, 180 g/l, 190 g/l, 200 g/l, 300 g/l, 400 g/l, 500 g/l, 550 g/l, 600 g/l, 650 g/l, 700 g/l, 800 g/l, 900 g/l, 1000 g/l, 2000 g/l o 5000 g/l del material de cromatografía de modo mixto. En algunos modos de realización, la composición se carga sobre un material de cromatografía de modo mixto a una densidad de carga del polipéptido de aproximadamente cualquiera de aproximadamente cualquiera de 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l, 130 g/l, 140 g/l, 150 g/l, 160 g/l, 170 g/l, 180 g/l, 190 g/l, 200 g/l, 300 g/l, 400 g/l, 500 g/l, 550 g/l, 600 g/l, 650 g/l, 700 g/l, 800 g/l, 900 g/l, 1000 g/l o 2000 g/l del material cromatográfico de modo mixto. La composición puede cargarse en un material de cromatografía de modo mixto a una densidad de carga del polipéptido de entre aproximadamente cualquiera de 30 g/l y 2000 g/l, 30 g/l y 1000 g/l, 30 g/l y 200 g/l, 30 g/l y 180 g/l, 50 g/l y 2000 g/l, 50 g/l y 1000 g/l, 50 g/l y 200 g/l, 50 g/l y 180 g/l, 150 g/l y 1500 g/l, 150 g/l y 1000 g/l, 200 g/l y 1000 g/l, 200 g/l y 1500 g/l, 300 g/l y 1500 g/l, 400 g/l y 1000 g/l, o 500 g/l y 1000 g/l de material de cromatografía de modo mixto. En algunos modos de realización, el polipéptido se carga sobre un material de cromatografía a una densidad de 70 g/l a 180 g/l. En algunos modos de realización de la invención, la cromatografía en modo mixto es una resina Capto Adhere. En algunos modos de realización, el polipéptido se carga sobre un material de cromatografía Capto Adhere a una densidad de 70 g/l a 180 g/l. En otros modos de realización de las modos de realización anteriores, el polipéptido es un anticuerpo de un fragmento del mismo.

10

15

20

25

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la composición se carga sobre un material de cromatografía de intercambio aniónico a una densidad de carga del polipéptido de más de aproximadamente cualquiera de 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l, 130 g/l, 140 g/l, 150 g/l, 160 g/l, 170 g/l, 180 g/l, 190 g/l, 200 g/l, 300 g/l, 400 g/l, 500 g/l, 550 g/l, 600 g/l, 650 g/l, 700 g/l, 800 g/l, 900 g/l, 1000 g/l, 2000 g/l o 5000 g/l del material de cromatografía de intercambio aniónico. En algunos modos de realización, la composición se carga sobre un material de cromatografía de intercambio aniónico a una densidad de carga del polipéptido de aproximadamente cualquiera de aproximadamente cualquiera de 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l, 130 g/l, 140 g/l, 150 g/l, 160 g/l, 170 g/l, 180 g/l, 200 g/l, 300 g/l, 400 g/l, 500 g/l, 550 g/l, 600 g/l, 650 g/l, 700 g/l, 800 g/l, 900 g/l, 1000 g/l o 2000 g/l del material de cromatografía de intercambio aniónico. La composición puede cargarse sobre un material de cromatografía de intercambio aniónico a una densidad de carga del polipéptido entre aproximadamente cualquiera de 30 g/l y 2000 g/l, 30 g/l y 1000 g/l, 30 g/l y 200 g/l, 30 g/l y 180 g/l, 50 g/l y 2000 g/l, 50 g/l y 1000 g/l, 50 g/l y 200 g/l, 50 g/l y 180 g/l, 150 g/l y 1500 g/l, 150 g/l y 1000 g/l, 200 g/l y 1000 g/l, 200 g/l y 1500 g/l, 300 g/l y 1500 g/l, 400 g/l y 1000 g/l, o 500 g/l y 1000 g/l del material de cromatografía de intercambio aniónico.

30

35

40

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la composición se carga sobre un material de cromatografía de intercambio catiónico a una densidad de carga del polipéptido de más de aproximadamente cualquiera de 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l, 130 g/l, 140 g/l, 150 g/l, 160 g/l, 170 g/l, 180 g/l, 190 g/l, 200 g/l, 300 g/l, 400 g/l, 500 g/l, 550 g/l, 600 g/l, 650 g/l, 700 g/l, 800 g/l, 900 g/l, 1000 g/l, 2000 g/l o 5000 g/l del material de cromatografía de intercambio catiónico. En algunos modos de realización, la composición se carga sobre un material de cromatografía de intercambio catiónico a una densidad de carga de aproximadamente cualquiera de aproximadamente cualquiera de 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 130 g/l, 160 g/l, 170 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l, 130 g/l, 700 g/l, 650 g/l, 700 g/l, 200 g/l, 300 g/l, 400 g/l, 500 g/l, 550 g/l, 800 g/l, 900 g/l, 1000 g/l o 2000 g/l del material de cromatografía de intercambio catiónico. La composición puede cargarse sobre un material de cromatografía de intercambio catiónico a una densidad de carga del polipéptido de entre aproximadamente cualquiera de 30 g/l y 2000 g/l, 30 g/l y 1000 g/l, 30 g/l y 200 g/l, 30 g/l y 180 g/l, 50 g/l y 2000 g/l, 50 g/l y 1000 g/l, 50 g/l y 200 g/l, 50 g/l y 180 g/l, 150 g/l y 1500 g/l, 150 g/l y 1000 g/l, 200 g/l y 1000 g/l, 200 g/l y 1500 g/l, 300 g/l y 1500 g/l, 400 g/l y 1000 g/l, o 500 g/l y 1000 g/l del material de cromatografía de intercambio catiónico.

45

50

55

Los procedimientos descritos anteriormente pueden comprender además la etapa de carga sobre un material de cromatografía de afinidad de Proteína A. En algunos modos de realización, el producto polipeptídico es un anticuerpo o fragmento del mismo que se purifica primeramente mediante cromatografía de afinidad de Proteína A antes que por OEC. La etapa de carga sobre un material de cromatografía de afinidad de Proteína A se realiza generalmente, pero no necesariamente, antes de la(s) otra(s) etapa(s) de cromatografía. En algunos modos de realización, la etapa de carga sobre un material de cromatografía de afinidad de Proteína A puede combinarse con las etapas secuenciales de intercambio con sobrecarga y cromatografía de elución. En algunos modos de realización, las etapas secuenciales son continuas. En algunos modos de realización, la purificación continua utiliza el mismo caudal, conductividad y/o pH.

60

65

La elución del producto tal como un polipéptido del material de cromatografía en modo OEC puede optimizarse para el rendimiento del producto con contaminantes mínimos y con un volumen de agrupación mínimo. Por ejemplo, la

composición puede cargarse sobre el material de cromatografía, por ejemplo, una columna de cromatografía, en un tampón de carga. Una vez completada la carga, el producto se eluye con tampones a una pluralidad de pH diferentes mientras que la conductividad del tampón de elución es constante. De forma alternativa, el producto puede eluirse del material de cromatografía en un tampón de elución en una pluralidad de conductividades diferentes mientras que el pH del tampón de elución es constante. Una vez completada la elución del producto a partir del material de cromatografía, la cantidad de contaminante en la fracción de la agrupación proporciona información relativa a la separación del producto de los contaminantes para un pH o conductividad dado. La elución del producto en un número elevado de fracciones (por ejemplo, ocho volúmenes de columna) indica «cola» del perfil de elución. En algunos modos de realización de la invención, la reducción de la elución se minimiza.

Varios tampones que pueden emplearse dependiendo, por ejemplo, del pH deseado del tampón, de la conductividad deseada del tampón, de las características de la proteína de interés y del procedimiento de purificación. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria, los procedimientos comprenden el uso de un tampón. El tampón puede ser un tampón de carga, un tampón de equilibrado o un tampón de lavado. En algunos modos de realización, uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado son los mismos. En algunos modos de realización, el tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado son diferentes. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón comprende una sal. El tampón de carga puede comprender cloruro de sodio, acetato de sodio o una mezcla de los mismos. En algunos modos de realización, el tampón de carga es un tampón de cloruro de sodio. En algunos modos de realización, el tampón de carga es un tampón de acetato de sodio.

La carga, tal como se usa en el presente documento, es la composición cargada sobre un material de cromatografía. El tampón de carga es el tampón usado para cargar la composición que comprende el producto de interés sobre un material de cromatografía. El material de cromatografía se puede equilibrar con un tampón de equilibrado antes de cargar la composición que se va a purificar. En algunos ejemplos, el tampón de lavado se usa después de cargar la composición sobre un material de cromatografía y antes de la elución del polipéptido de interés de la fase sólida. Sin embargo, parte del producto de interés, por ejemplo, un polipéptido, se puede eliminar del material de cromatografía mediante el tampón de lavado (por ejemplo, similar a un modo de flujo continuo).

La elución, tal como se usa en el presente documento, es la eliminación del producto, por ejemplo, polipéptido, a partir del material de cromatografía. El tampón de elución es el tampón usado para eluir el polipéptido u otro producto de interés a partir de un material de cromatografía. En muchos casos, un tampón de elución tiene una característica física diferente que el tampón de carga. Por ejemplo, el tampón de elución puede tener una conductividad diferente que el tampón de carga o un pH diferente del tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad más baja que el tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad más alta que el tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene un pH menor que el tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene un pH más alto que el tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad diferente y un pH diferente del tampón de carga. El tampón de elución puede tener cualquier combinación de conductividad superior o inferior y pH más alto o más bajo.

La conductividad se refiere a la capacidad de una solución acuosa para conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. En solución, la corriente fluye por transporte iónico. Por lo tanto, con una cantidad creciente de iones presentes en la solución acuosa, la solución tendrá una mayor conductividad. La unidad básica de medida para la conductividad es el Siemen (o mho), mho (mS/cm), y se puede medir usando un medidor de conductividad, como varios modelos de medidores de conductividad Orion. Puesto que la conductividad electrolítica es la capacidad de los iones en una solución para transportar corriente eléctrica, la conductividad de una solución se puede ver alterada cambiando la concentración de iones en ella. Por ejemplo, la concentración de un agente tamponante y/o la concentración de una sal (por ejemplo, cloruro de sodio, acetato de sodio o cloruro de potasio) en la solución pueden alterarse para conseguir la conductividad deseada. Preferentemente, la concentración de sal de los diversos tampones se modifica para conseguir la conductividad deseada.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de carga tiene una conductividad superior a aproximadamente cualquiera de 4,0 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm, o 10 mS/cm. La conductividad puede estar entre aproximadamente 4 mS/cm y 17 mS/cm, 4 mS/cm y 10 mS/cm, 4 mS/cm y 7 mS/cm, 5 mS/cm y 17 mS/cm, 5 mS/cm y 10 mS/cm, o 5 mS/cm y 7 mS/cm. En algunos modos de realización, la conductividad es de aproximadamente 4 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm, o 10 mS/cm. En un aspecto, la conductividad es la conductividad del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado. En algunos modos de realización, la conductividad de uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y el tampón de lavado es la misma. En algunos modos de realización, la conductividad del tampón de carga es diferente de la conductividad del tampón de lavado y/o del tampón de equilibrado. En algunos modos de realización, la composición se carga sobre un material de cromatografía de modo mixto en un tampón con una conductividad de aproximadamente 5,5 mS/cm. En algunos modos de realización, el polipéptido es un anticuerpo o fragmento del mismo.

En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad menor que la conductividad del tampón de carga. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de elución tiene una conductividad inferior a aproximadamente cualquiera de 0,0 mS/cm, 0,5 mS/cm, 1,0 mS/cm, 1,5 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,5 mS/cm, 3,0 mS/cm, 3,5 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, o 7,0 mS/cm. La conductividad puede estar entre aproximadamente cualquiera de 0 mS/cm y 7 mS/cm, 1 mS/cm y 7 mS/cm, 2 mS/cm y 7 mS/cm, 3 mS/cm y 7 mS/cm, o 4 mS/cm y 7 mS/cm, 0 mS/cm y 5,0 mS/cm, 1 mS/cm y 5 mS/cm, 2 mS/cm y 5 mS/cm, 3 mS/cm y 5 mS/cm, o 4 mS/cm y 5 mS/cm. En algunos modos de realización, la conductividad del tampón de elución es aproximadamente cualquiera de 0,0 mS/cm, 0,5 mS/cm, 1,0 mS/cm, 1,5 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,5 mS/cm, 3,0 mS/cm, 3,5 mS/cm, 4 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, o 7,0 mS/cm. En algunos modos de realización, los tampones de elución descritos anteriormente se usan en OEC de modo mixto, OEC de intercambio de aniones, OEC de intercambio de cationes, OEC de afinidad u OEC HIC.

En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad mayor que la conductividad del tampón de carga. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de elución tiene una conductividad mayor que aproximadamente cualquiera de 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17,0 mS/cm, 18,0 mS/cm, 19,0 mS/cm, 20,0 mS/cm, 21,0 mS/cm, 22,0 mS/cm, 23,0 mS/cm, 24,0 mS/cm, o 25,0 mS/cm. La conductividad puede estar entre aproximadamente 5,5 mS/cm y 17 mS/cm, 6,0 mS/cm y 17 mS/cm, 7 mS/cm y 17 mS/cm, 8 mS/cm y 17 mS/cm, 9 mS/cm y 17 mS/cm, o 10 mS/cm y 17 mS/cm. En algunos modos de realización, la conductividad del tampón de elución es de aproximadamente cualquiera de 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, o 17,0 mS/cm. En algunos modos de realización, los tampones de elución descritos anteriormente se usan en OEC de modo mixto, OEC de intercambio aniónico, OEC de intercambio de cationes, OEC de afinidad, o OEC HIC. En algunos modos de realización, el polipéptido se eluye de una cromatografía de modo mixto con una conductividad de aproximadamente 4 a aproximadamente 1 mS/cm. En algunos modos de realización, el polipéptido se eluye de una cromatografía Capto Adhere a una conductividad de aproximadamente 4 a aproximadamente 1 mS/cm. En algunos modos de realización, se eluye un anticuerpo o fragmento del mismo a partir de una cromatografía Capto Adhere con una conductividad de aproximadamente 4 mS/cm a aproximadamente 1 mS/cm.

En algunos aspectos de cualquiera de los modos de realización anteriores, la conductividad del tampón de elución cambiaba del tampón de carga y/o tampón de lavado por gradiente escalonado o por gradiente lineal.

En algunos modos de realización de la invención, la composición que comprende un polipéptido se carga sobre el material de cromatografía en un tampón con una conductividad de aproximadamente 5,5 mS/cm y el polipéptido se eluye del material de cromatografía en un tampón de elución con una conductividad de aproximadamente 4 mS/cm. En algunos modos de realización, el tampón de carga tiene una conductividad de aproximadamente 5,5 mS/cm y el tampón de elución tiene una conductividad de aproximadamente 3 mS/cm. En algunos modos de realización, el tampón de carga tiene una conductividad de aproximadamente 5,5 mS/cm y el tampón de elución tiene una conductividad de aproximadamente 2 mS/cm. En algunos modos de realización, el tampón de carga tiene una conductividad de aproximadamente 5,5 mS/cm y el tampón de elución tiene una conductividad de aproximadamente 1 mS/cm. En modos de realización adicionales de los modos de realización anteriores, el material de cromatografía es una resina Capto Adhere. En modos de realización adicionales de los modos de realización anteriores, el polipéptido es un anticuerpo de su fragmento.

En algunos aspectos de cualquiera de los modos de realización anteriores, la conductividad del tampón de elución cambiaba del tampón de carga y/o tampón de lavado por gradiente escalonado o por gradiente lineal. En algunos modos de realización, la composición que comprende un polipéptido se carga en una cromatografía Capto Adhere a aproximadamente 5,5 mS/cm y el polipéptido de interés se eluye de una cromatografía Capto Adhere mediante un gradiente de conductividad lineal de aproximadamente 5,5 mS/cm a aproximadamente 1 mS/cm sobre unos 5 volúmenes de columna (VC). En algunos modos de realización, la composición que comprende un polipéptido se carga en una cromatografía Capto Adhere a aproximadamente 5,5 mS/cm y el polipéptido de interés se eluye de una cromatografía Capto Adhere por un gradiente de conductividad lineal de aproximadamente 5,5 mS/cm a aproximadamente 1 mS/cm más de 10,0 VC. En algunos modos de realización, la composición que comprende un polipéptido se carga en una cromatografía Capto Adhere a aproximadamente 10 mS/cm y el polipéptido de interés se eluye de una cromatografía Capto Adhere mediante un gradiente lineal de conductividad de aproximadamente 10,0 mS/cm a aproximadamente 1 mS/cm sobre aproximadamente 5 VC. En algunos modos de realización, la composición que comprende un polipéptido se carga en una cromatografía Capto Adhere a aproximadamente 10 mS/cm y el polipéptido de interés se eluye de una cromatografía Capto Adhere mediante un gradiente de conductividad lineal de aproximadamente 10,0 mS/cm a 1 mS/cm sobre aproximadamente 10 VC. En algunos modos de realización, la composición que comprende un polipéptido se carga en una cromatografía Capto Adhere a aproximadamente 10 mS/cm y el polipéptido de interés se eluye de una cromatografía Capto Adhere mediante un gradiente de conductividad lineal de aproximadamente 10,0 mS/cm hasta 1 mS/cm sobre unos 15 VC.

En algunos aspectos de cualquiera de los modos de realización anteriores, la conductividad del tampón de elución cambiaba del tampón de carga y/o tampón de lavado por gradiente escalonado o por gradiente lineal. En algunos

- modos de realización, la composición que comprende un polipéptido se carga sobre un material de cromatografía a aproximadamente 5,5 mS/cm y el polipéptido de interés se eluye de un material de cromatografía mediante un gradiente de conductividad lineal entre 5,5 mS/cm a 1 mS/cm sobre 5 Columnas Volúmenes, 5,5 mS/cm a 1 mS/cm sobre 10,0 volúmenes de columna. En algunos modos de realización, la composición que comprende un polipéptido se carga sobre un material de cromatografía a aproximadamente 10 mS/cm y el polipéptido de interés se eluye de un material de cromatografía mediante un gradiente lineal de conductividad entre 10,0 mS/cm a 1 mS/cm sobre 5 volúmenes de columna, de 10,0 mS/cm a 1 mS/cm sobre 10 volúmenes de columna, de 10,0 mS/cm a 1 mS/cm sobre 15 volúmenes de columna.
- En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria, el tampón de carga tiene un pH menor que aproximadamente cualquiera de 10, 9, 8, 7, 6 ó 5. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de carga tiene un pH mayor que aproximadamente cualquiera de 4, 5, 6, 7, 8, ó 9. El tampón de carga puede tener un pH de entre aproximadamente 4 y 9, 4 y 8, 4 y 7, 5 y 9, 5 y 8, 5 y 7, 5 y 6. En algunos modos de realización, el pH del tampón de carga es aproximadamente cualquiera de 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 u 8. El pH puede ser el pH del tampón de carga, el tampón de equilibrado o el tampón de lavado. En algunos modos de realización, el pH de uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado es el mismo. En algunos modos de realización, el pH del tampón de carga es diferente del pH del tampón de equilibrado y/o del tampón de lavado.
- En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene un pH menor que el pH del tampón de carga. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de elución tiene un pH menor que aproximadamente cualquiera de 8, 7, 6, 5, 4, 3 ó 2. El pH del tampón de elución puede estar entre aproximadamente 4 y 9, 4 y 8, 4 y 7, 4 y 6, 4 y 5, 5 y 9, 5 y 8, 5 y 7, 5 y 6, 6 y 9, 6 y 8, 6 y 7. En algunos modos de realización, el pH del tampón de elución es aproximadamente cualquiera de 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7, 0,7, 5, 8,0, 8,5 o 9,0).
- En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene un pH mayor que el pH del tampón de carga. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de elución tiene un pH mayor que aproximadamente cualquiera de 5, 6, 7, 8, o 9. El pH del tampón de elución puede estar entre aproximadamente 4 y 9, 5 y 9, 6 y 9, 7 y 9, 8 y 9, 4 y 8, 5 y 8, 6 y 8, 7 y 8, 4 y 7, 5 y 7, y 6 y 7. En algunos modos de realización, el pH del tampón de elución es aproximadamente cualquiera de 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7, 0, 7,5, 8,0, 8,5 o 9,0).
- En algunos aspectos de cualquiera de los modos de realización anteriores, el pH del tampón de elución cambiaba del tampón de carga y/o tampón de lavado por gradiente escalonado o por gradiente lineal.
- En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria, el caudal es menor que aproximadamente 50 VC/h, 40 VC/h, o 30 VC/h. El caudal puede estar entre aproximadamente cualquiera de 5 VC/h y 50 VC/h, 10 VC/hora y 40 VC/h, o 18 VC/hora y 36 VC/h. En algunos modos de realización, el caudal es de aproximadamente cualquiera de 9 VC/h, 18 VC/h, 25 VC/h, 30 VC/h, 36 VC/h, o 40 VC/h. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el caudal es menor que aproximadamente cualquiera de 100 cm/h, 75 cm/h, o 50 cm/h. El caudal puede estar entre aproximadamente cualquiera de 25 cm/h y 150 cm/h, 25 cm/h y 100 cm/h, 50 cm/h y 100 cm/h, o 65 cm/h y 85 cm/h.
- La altura del lecho es la altura del material de cromatografía usado. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la altura del lecho es mayor que aproximadamente cualquiera de 3 cm, 10 cm o 15 cm. La altura del lecho puede estar entre aproximadamente cualquiera de 3 cm y 35 cm, 5 cm y 15 cm, 3 cm y 10 cm, o 5 cm y 8 cm. En algunos modos de realización, la altura del lecho es de aproximadamente cualquiera de 3 cm, 5 cm, 10 cm o 15 cm. En algunos modos de realización, la altura del lecho se determina en base a la cantidad de polipéptido o contaminantes en la carga.
- En algunos modos de realización, la cromatografía es en una columna de recipiente con un volumen de más de aproximadamente 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 25 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 75 ml, 100 ml, 200 ml, 300 ml, 400 ml, 500 ml, 600 ml, 700 ml, 800 ml, 900 ml, 1 l, 2 l, 3 l, 4 l, 5 l, 6 l, 7 l, 8 l, 9 l, 10 l, 25 l, 50 l, 100 l, 200 l, 300 l, 400 l, 500 l, 600 l, 700 l, 800 l, 900 l o 100 l.
- En algunos modos de realización de la invención, las fracciones se recogen de la cromatografía. En algunos modos de realización, las fracciones recogidas son mayores de aproximadamente 0,01 VC, 0,02 VC, 0,03 VC, 0,04 VC, 0,05 VC, 0,06 VC, 0,07 VC, 0,08 VC, 0,09 VC, 0,1 VC, 0,2 VC, 0,3 VC, 0,4 VC, 0,5 VC, 0,6 VC, 0,7 VC, 0,8 VC, 0,9 VC, 1,0 VC, 2,0 VC, 3,0 VC, 4,0 VC, 5,0 VC, 6,0 VC, 7,0 VC, 8,0 VC, 9,0 VC o 10,0 VC. En algunos modos de realización se combinan las fracciones que contienen el producto, por ejemplo, polipéptido. En algunos modos de realización, las fracciones que contienen el polipéptido de las fracciones de carga y de las fracciones de elución se combinan. La cantidad de polipéptido en una fracción puede ser determinada por un experto en la técnica; por ejemplo, la cantidad de polipéptido en una fracción se puede determinar por espectroscopia UV. En algunos modos de realización, las fracciones que contienen fragmento de polipéptido detectable se combinan.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el al menos un contaminante es uno o más de los materiales de la célula huésped, tales como CHOP; proteína A lixiviada; ácido nucleico; una variante, fragmento, agregado o derivado del polipéptido deseado; otro polipéptido; endotoxina; contaminante viral; el componente de los medios de cultivo celular, la carboxipeptidasa B, la gentamicina, etc. En algunos ejemplos, el contaminante puede ser una proteína de célula huésped (HCP), por ejemplo, pero no limitada a, una célula bacteriana tal como una célula de *E. coli*, una célula de insecto, una célula procarionta, una célula eucariota, una célula de levadura, una célula de mamífero, una célula aviar, una célula fúngica.

Las proteínas de células huésped (HCP) son proteínas de las células en las que se produjo el polipéptido. Por ejemplo, CHOP son proteínas de células huésped, es decir, proteínas de ovario de hámster chino. La cantidad de CHOP puede medirse mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas («ELISA») o Meso Scale Discovery («MSO»). En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cantidad de HCP (por ejemplo, CHOP) se reduce en más de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %. La cantidad de HCP puede reducirse entre aproximadamente cualquiera de un 10 % y 99 %, 30 % y 95 %, 30 % y 99 %, 50 % y 95 %, 50 % y 99 %, 75 % y 99 %, o 85 % y 99 %. En algunos modos de realización, la cantidad de HCP se reduce en aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 %. En algunos modos de realización, la reducción se determina comparando la cantidad de HCP en la composición recuperada de una etapa o etapas de purificación a la cantidad de HCP en la composición antes de la etapa o etapas de purificación.

El polipéptido agregado puede ser una proteína de alto peso molecular (HMW). En algunos modos de realización, el polipéptido agregado es múltiplo del polipéptido de interés. La proteína HMW puede ser un dímero, hasta 8x monómero, o mayor del polipéptido de interés. Los procedimientos de medición de la proteína agregada (por ejemplo, proteína HMW) se conocen en la técnica y se describen en la sección de ejemplos. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cantidad de proteína agregada se reduce en más de aproximadamente cualquiera de un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %. La cantidad de proteína agregada puede reducirse entre aproximadamente cualquiera de un 10 % y 99 %, 30 % y 95 %, 30 % y 99 %, 50 % y 95 %, 50 % y 99 %, 75 % y 99 %, o 85 % y 99 %. La cantidad de proteína agregada puede reducirse aproximadamente cualquiera de un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %. En algunos modos de realización, la reducción se determina comparando la cantidad de proteína agregada (por ejemplo, proteína HMW) en la composición recuperada de una etapa o etapas de purificación a la cantidad de proteína agregada (por ejemplo, proteína HMW) en la composición antes de la etapa o etapas de purificación.

El polipéptido fragmentado puede ser proteína de bajo peso molecular (LMW). En algunos modos de realización, el polipéptido fragmentado es un fragmento del polipéptido de interés. Ejemplos de proteína LMW incluyen, pero no se limitan a, un Fab (unión a antígeno fragmento), Fc (fragmento, cristalizante) o combinación de ambos o cualquier parte aleatoria fragmentada de un anticuerpo de interés. Los procedimientos para medir la proteína fragmentada (por ejemplo, proteína LMW) se conocen en la técnica y se describen en la sección de ejemplos. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cantidad de proteína LMW se reduce en más de aproximadamente cualquiera de un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %. La cantidad de proteína LMW puede reducirse entre aproximadamente cualquiera de un 10 % y 99 %, 30 % y 95 %, 30 % y 99 %, 50 % y 95 %, 50 % y 99 %, 75 % y 99 %, o 85 % y 99 %. La cantidad de proteína LMW puede reducirse aproximadamente cualquiera de un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %. En algunos modos de realización, la reducción se determina comparando la cantidad de proteína fragmentada (por ejemplo, proteína LMW) en la composición recuperada de una etapa o etapas de purificación a la cantidad de proteína fragmentada (por ejemplo, proteína LMW) en la composición antes de la etapa o etapas de purificación.

La Proteína A lixiviada es la Proteína A separada o lavada de una fase sólida a la que está unida. Por ejemplo, la Proteína A lixiviada puede ser lixiviada de la columna de cromatografía de Proteína A. La cantidad de Proteína A se puede medir, por ejemplo, mediante ELISA. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cantidad de Proteína A lixiviada se reduce en más de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %. La cantidad de Proteína A lixiviada puede reducirse entre aproximadamente cualquiera de un 10 % y 99 %, 30 % y 95 %, 30 % y 99 %, 50 % y 95 %, 50 % y 99 %, 75 % y 99 % o 85 % y 99 %. En algunos modos de realización, la cantidad de Proteína A lixiviada se reduce aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %. En algunos modos de realización, la reducción se determina comparando la cantidad de Proteína A lixiviada en la composición recuperada de una etapa o etapas de purificación con la cantidad de Proteína A lixiviada en la composición antes de la etapa o etapas de purificación.

Los procedimientos de medición del ADN, tales como el ADN de la célula huésped, se conocen en la técnica y se describen en la sección de ejemplos. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cantidad de ADN se reduce en más de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %. La cantidad de ADN puede reducirse entre aproximadamente cualquiera de un 10 % y 99 %, 30 % y 95 %, 30 % y 99 %, 50 % y 95 %, 50 % y 99 %, 75 % y 99 %, o 85 % y 99 %. La cantidad de ADN puede reducirse aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %. En algunos modos de realización, la reducción se determina comparando la cantidad de ADN en la composición

recuperada de una etapa o etapas de purificación con la cantidad de ADN en la composición antes de la etapa o etapas de purificación.

5 Componente de medio de cultivo celular se refiere a un componente presente en un medio de cultivo celular. Un medio de cultivo celular puede ser un medio de cultivo celular en el momento de la recolección de células. En algunos modos de realización, el componente de medio de cultivo celular es gentamicina. La cantidad de gentamicina se puede medir mediante ELISA. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cantidad de componente de medio de cultivo celular se reduce en más de aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %. La cantidad de componente de medio de cultivo celular puede reducirse entre aproximadamente cualquiera de un 10 % y 99 %, 30 % y 95 %, 30 % y 99 %, 50 % y 95 %, 50 % y 99 %, 75 % y 99 %, u 85 % y 99 %. En algunos modos de realización, la cantidad de componente de medio de cultivo celular se reduce aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % . En algunos modos de realización, la reducción se determina comparando la cantidad de componente de medio de cultivo celular en la composición recuperada de una etapa o etapas de purificación con la cantidad de componente de medio de cultivo celular en la composición antes de la etapa o etapas de purificación.

20 En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los procedimientos pueden comprender además una o más etapas de purificación ya sea antes o después de cualquiera de las OEC descritas en el presente documento. Otros procedimientos de purificación incluyen, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico tal como cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de afinidad tal como cromatografía de proteína A y cromatografía de proteína G, cromatografía de modo mixto, cromatografía de hidroxilapatita; cromatografía de filtración en gel; cromatografía de afinidad; electroforesis en gel; diálisis; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice; cromatofocalización; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; y columnas quelantes metálicas para unirse a las formas marcadas con epítipo del polipéptido.

30 En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los procedimientos comprenden además la recuperación del polipéptido purificado. En algunos modos de realización, el polipéptido purificado se recupera de cualquiera de las etapas de purificación descritas en el presente documento. La etapa de cromatografía puede ser cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía en modo mixto o cromatografía de Proteína A. En algunos modos de realización, la cromatografía de OEC es una cromatografía de modo mixto y la cromatografía adicional es una cromatografía de intercambio aniónico. En algunos modos de realización, la cromatografía de OEC es una cromatografía de modo mixto y la cromatografía adicional es una cromatografía de intercambio catiónico. En algunos modos de realización, la cromatografía de OEC es una cromatografía de modo mixto y la cromatografía adicional es una cromatografía HIC. En algunos modos de realización, la cromatografía de OEC es una cromatografía de intercambio aniónico y la cromatografía adicional es una cromatografía de intercambio catiónico. En algunos modos de realización, la cromatografía de OEC es una cromatografía de intercambio aniónico y la cromatografía adicional es una cromatografía de modo mixto. En algunos modos de realización, la cromatografía de OEC es una cromatografía de intercambio aniónico y la cromatografía adicional es una cromatografía HIC. En algunos modos de realización, la cromatografía de OEC es una cromatografía de intercambio catiónico y la cromatografía adicional es una cromatografía de modo mixto. En algunos modos de realización, la cromatografía de OEC es una cromatografía de intercambio catiónico y la cromatografía adicional es una cromatografía de modo mixto. En algunos modos de realización, la cromatografía de OEC es una cromatografía de intercambio aniónico y la cromatografía adicional es una cromatografía HIC. En algunos modos de realización, la cromatografía de OEC es una cromatografía HIC y la cromatografía adicional es una cromatografía de modo mixto. En algunos modos de realización, la cromatografía de OEC es una cromatografía HIC y la cromatografía adicional es una cromatografía de intercambio aniónico. En algunos modos de realización, la cromatografía de OEC es una cromatografía HIC y la cromatografía adicional es una cromatografía de intercambio catiónico.

50 En algunos modos de realización, el polipéptido se purifica adicionalmente después de OEC por filtración vírica. La filtración vírica es la eliminación de contaminantes víricos en una corriente de alimentación de purificación de polipéptidos. Los ejemplos de filtración vírica incluyen ultrafiltración y microfiltración. En algunos modos de realización, el polipéptido se purifica utilizando un filtro de parvovirus.

55 En algunos modos de realización, el polipéptido se concentra después de la cromatografía por el modo OEC. Se conocen ejemplos de procedimientos de concentración en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, ultrafiltración y diafiltración.

60 En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los procedimientos comprenden además combinar el polipéptido purificado de los procedimientos de purificación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

65 En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para purificar un anticuerpo que comprende a) cargar una composición que comprende el anticuerpo en una resina Capto Adhere con una densidad de carga de 150–200 g de anticuerpo por litro de resina Capto Adhere en un tampón de carga con un pH de aproximadamente 6,5 y una conductividad de aproximadamente 5,3 mS/cm a aproximadamente 5,6 mS/cm; b) eluir el anticuerpo de la resina

con un tampón de elución que comprende 100 mM de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) 100 mM con un pH de aproximadamente 6,5 y una conductividad de aproximadamente 1 mS/cm; y recoger una agrupación que comprende el anticuerpo.

5 En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para purificar un anticuerpo que comprende:
a) cargar una composición que comprende el anticuerpo en una resina Capto Adhere en una columna de 1,6–10,8 l a una densidad de carga de 70-180 g de anticuerpo por litro de resina Capto Adhere en un tampón de carga con un pH de aproximadamente 6,5 y una conductividad de aproximadamente 5,3 mS/cm a aproximadamente 5,6 mS/cm; b) eluir el anticuerpo de la resina con un tampón de elución que comprende MES 100 mM con un pH de aproximadamente 6,5 y una conductividad de aproximadamente 1 mS/cm; y recoger una agrupación que comprende el anticuerpo.

15 En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para purificar un anticuerpo que comprende:
a) cargar una composición que comprende el anticuerpo en una resina Capto Adhere con una densidad de carga de aproximadamente 200 g de anticuerpo por litro de resina Capto Adhere en un tampón de carga con un pH de aproximadamente 8,6 y una conductividad de aproximadamente menos de 6 mS/cm; b) eluir el anticuerpo de la resina con un tampón de elución de MES 20 mM con un pH de aproximadamente 6,5 y una conductividad de aproximadamente 1 mS/cm; y recoger una agrupación que comprende el anticuerpo.

20 En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para purificar un anticuerpo que comprende:
a) cargar una composición que comprende el anticuerpo en una resina Capto Adhere con una densidad de carga de aproximadamente 200 g de anticuerpo por litro de resina Capto Adhere en un tampón de carga con un pH de aproximadamente 6,1 y una conductividad de aproximadamente menos de 6 mS/cm; b) eluir el anticuerpo de la resina con un tampón de elución de MES 20 mM con un pH de aproximadamente 6,0 y una conductividad de aproximadamente 0,65 mS/cm; y recoger una agrupación que comprende el anticuerpo.

25 En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para purificar un anticuerpo que comprende:
a) cargar una composición que comprende el anticuerpo en una resina Capto Adhere con una densidad de carga de aproximadamente 200 g de anticuerpo por litro de resina Capto Adhere en un tampón de carga con un pH de aproximadamente 5,5 y una conductividad de aproximadamente menos de 6 mS/cm; b) eluir el anticuerpo de la resina con un tampón de elución de MES 20 mM con un pH de aproximadamente 4,9 y una conductividad de aproximadamente 1,1 mS/cm; y recoger una agrupación que comprende el anticuerpo.

35 En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para purificar un anticuerpo que comprende:
a) cargar una composición que comprende el anticuerpo en una resina Capto Adhere con una densidad de carga de aproximadamente 200 g de anticuerpo por litro de resina Capto Adhere en un tampón de carga con un pH de aproximadamente 6,5 y una conductividad de aproximadamente menos de 6 mS/cm; b) eluir el anticuerpo de la resina con un tampón de elución de MES 20 mM con un pH de aproximadamente 6,5 y una conductividad de aproximadamente 1 mS/cm; y recoger una agrupación que comprende el anticuerpo.

40 En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para purificar un anticuerpo que comprende:
a) cargar una composición que comprende el anticuerpo sobre una resina QMA con una densidad de carga de aproximadamente 103 g de anticuerpo por litro de resina QMA en un tampón de carga con un pH de aproximadamente 6,5 y una conductividad de aproximadamente menos de 5,5 mS/cm; b) eluir el anticuerpo de la resina con un tampón de elución de MES 20 mM con un pH de aproximadamente 6,5 y una conductividad de aproximadamente 1 mS/cm; y recoger una agrupación que comprende el anticuerpo.

50 En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para purificar un anticuerpo que comprende:
a) cargar una composición que comprende el anticuerpo en una resina Poros XS a una densidad de carga de aproximadamente 200 g de anticuerpo por litro de resina Poros XS en un tampón de carga con un pH de aproximadamente 5,5 y una conductividad de aproximadamente menos de 6 mS/cm; b) eluir el anticuerpo de la resina con un tampón de elución de acetato 50-350 mM con un pH de aproximadamente 5,5; y recoger una piscina que comprende el anticuerpo.

55 En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para purificar un anticuerpo que comprende:
a) cargar una composición que comprende el anticuerpo en una resina Capto MMC a una densidad de carga de aproximadamente 147 g de anticuerpo por litro de resina Capto MMC en un tampón de carga con un pH de aproximadamente 7,0 y una conductividad de aproximadamente menos de 6 mS/cm; b) eluir el anticuerpo de la resina con un tampón de elución de MES 20 mM con un pH de aproximadamente 6,5 y una conductividad de aproximadamente 1 mS/cm; y recoger una piscina que comprende el anticuerpo.

60 **III Polipéptidos**

Se proporcionan polipéptidos para su uso en cualquiera de los procedimientos de purificación de polipéptidos y formulaciones que comprenden los polipéptidos purificados por los procedimientos descritos en el presente documento.

65

En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para purificar un polipéptido usando cromatografía de sobrecarga y elución. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un polipéptido terapéutico. En algunos modos de realización, el polipéptido es un antagonista. En algunos modos de realización, el polipéptido es un agonista. En algunos modos de realización, el polipéptido es un anticuerpo. En algunos modos de realización, el polipéptido es un epítipo marcado. En algunos modos de realización, el polipéptido retiene una actividad biológica y/o inmunológica. En algunos modos de realización, el polipéptido es un antagonista. En algunos modos de realización, el polipéptido inicia la citotoxicidad dependiente del complemento. En algunos modos de realización, el polipéptido es un anticuerpo o inmunoadhesina. En modos de realización adicionales de los modos de realización anteriores, el polipéptido es purificado por OEC usando un medio de cromatografía de modo mixto. En modos de realización adicionales de los modos de realización anteriores, el polipéptido es purificado por OEC usando un medio de cromatografía de intercambio aniónico. En modos de realización adicionales de los modos de realización anteriores, el polipéptido es purificado por OEC usando un medio de cromatografía de intercambio catiónico. En modos de realización adicionales de los modos de realización anteriores, el polipéptido es purificado por OEC usando un medio de cromatografía HIC. En modos de realización adicionales de los modos de realización anteriores, el polipéptido es purificado por OEC usando un medio de cromatografía HAP. En modos de realización adicionales de los modos de realización anteriores, el polipéptido es purificado por OEC usando un medio de cromatografía de afinidad. En modos de realización adicionales de los modos de realización anteriores, el polipéptido es purificado por OEC usando un medio de cromatografía que no es, o no incluye, una cromatografía de intercambio catiónico.

En algunos modos de realización, el polipéptido tiene un peso molecular superior a aproximadamente cualquiera de 5000 Daltons, 10 000 Daltons, 15 000 Daltons, 25 000 Daltons, 50 000 Daltons, 75 000 Daltons, 100 000 Dalton, 125 000 Daltons o 150 000 Daltons. El polipéptido puede tener un peso molecular entre aproximadamente cualquiera de 50. 000 Daltons a 200 000 Daltons o 100 000 Daltons a 200 000 Daltons. Alternativamente, el polipéptido para uso en esta invención puede tener un peso molecular de aproximadamente 120 000 Daltons o aproximadamente 25 000 Daltons.

pI es el punto isoeléctrico y es el pH al cual una molécula o superficie particular no porta carga eléctrica neta. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria, el pI del polipéptido puede estar entre aproximadamente cualquiera de 6 a 10, 7 a 9 u 8 a 9. En algunos modos de realización, el polipéptido tiene un pI de aproximadamente cualquiera de 6, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10.

Los polipéptidos a purificar usando los procedimientos descritos en el presente documento se producen generalmente usando técnicas recombinantes. Los procedimientos para producir proteínas recombinantes se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.534.615 y 4.816.567, específicamente incorporadas en el presente documento a modo de referencia. En algunos modos de realización, la proteína de interés se produce en una célula CHO (véase, por ejemplo, el documento WO 94/11026). Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, o directamente secretado al medio.

Los polipéptidos pueden recuperarse del medio de cultivo o de lisados de células huésped. Las células empleadas en la expresión de los polipéptidos pueden ser interrumpidas por diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, ultrasonidos, interrupción mecánica o agentes de lisis celular. Si el polipéptido se produce intracelularmente, como un primer paso, los restos de partículas, bien células huésped o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar polipéptidos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*. En pocas palabras, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los residuos celulares se pueden eliminar por centrifugación. Cuando el polipéptido se secreta al medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de polipéptido disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa tal como PMSF se puede incluir en cualquiera de los pasos anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

Ejemplos de polipéptidos que pueden purificarse mediante los procedimientos de la invención incluyen pero no se limitan a inmunoglobulinas, inmunoadhesinas, anticuerpos, enzimas, hormonas, proteínas de fusión, proteínas que contienen Fc, inmunoconjugados, citocinas e interleucinas. Ejemplos de polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, proteínas de mamífero, tales como, por ejemplo, renina; una hormona; una hormona de crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante de la tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimuladora folicular; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrands; factores anti-coagulación tales como proteína C; factor natriurético atrial; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (regulada tras activación, expresada y secretada por células T normales); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una albúmina de suero tal como albúmina de suero humano; sustancia inhibidora de Muellerian; cadena A de la relaxina; cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una enzima; una proteína microbiana, tal

como beta-lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno citotóxico asociado a linfocitos T (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), la neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor crecimiento nervioso tal como NGF-b; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, o TGF- β 5; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP); una citocina; proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; un polipéptido de fusión, es decir, un polipéptido compuesto por dos o más polipéptidos heterólogos o fragmentos de los mismos y codificado por un ácido nucleico recombinante; un polipéptido que contiene Fc, por ejemplo, una proteína de fusión que comprende una región Fc de inmunoglobulina, o fragmento del mismo, fusionada a un segundo polipéptido; un inmunoconjugado; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (ILs), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración de la descomposición; antígeno viral tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura de SIDA; proteínas de transporte; receptores homing; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a un tumor tal como CA125 (antígeno de cáncer de ovario) o receptor HER2, HER3 o HER4; inmuno adhesinas; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, así como anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpo, unión a una proteína, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente.

(A) Anticuerpos

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el polipéptido para uso en cualquiera de los procedimientos de purificación de polipéptidos y formulaciones que comprenden los polipéptidos purificados por los procedimientos descritos en el presente documento es un anticuerpo.

Los dianas moleculares para anticuerpos incluyen las proteínas CD y sus ligandos, tales como, pero sin limitarse a: (i) CD3, CD4, CD8, CD19, CD11a, CD20, CD22, CD34, CD40, CD79 α (CD79a) y CD79 β (CD79b); (ii) miembros de la familia de receptores ErbB tales como el receptor EGF, receptor HER2, HER3 o HER4; (iii) moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM y α v β 3, incluyendo sus subunidades alfa o beta (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); (iv) factores de crecimiento tales como VEGF; IgE; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor *mpl*; CTLA-4; proteína C, BR3, c-met, factor tisular, β 7 etc.; y (v) la superficie celular y los antígenos asociados a tumores transmembrana (TAA), tales como los descritos en la Patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

Otros anticuerpos ejemplo incluyen los seleccionados entre, y sin limitación, el anticuerpo anti-receptor de estrógeno, anticuerpo anti-receptor de progesterona, anticuerpo anti-p53, el anticuerpo anti-HER-2/neu, anticuerpo anti-EGFR, el anticuerpo anti-catepsina D, anticuerpo anti-Bcl-2, anticuerpo anti-E-cadherina, anticuerpo anti-CA125, anticuerpo anti-CA15-3, anticuerpo anti-CA19-9, anticuerpo anti-c-erbB-2, anticuerpo anti-P-glicoproteína, anticuerpo anti-CEA, anticuerpo anti-proteína reitnoblastoma, anticuerpo anti-oncoproteína ras, anticuerpo anti-Lewis X, anticuerpo anti-Ki-67, anticuerpo anti-PCNA, anticuerpo-CD3, anticuerpo anti-CD4, anticuerpo anti-CD5, anticuerpo anti-CD7, anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD9/p24, anticuerpo anti-CD10, anticuerpo anti-CD11a, anticuerpo anti-CD11c, anticuerpo anti-CD13, anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD15, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-CD22, anticuerpo anti-CD23, anticuerpo anti-CD30, anticuerpo anti-CD31, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-CD34, anticuerpo anti-CD35, anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-CD41, anticuerpo anti-LCA/CD45, anticuerpo anti-CD45RO, anticuerpo anti-CD45RA, el anticuerpo anti-CD39, el anticuerpo anti-CD 100, anticuerpo anti-CD95/ Fas, anticuerpo anti-CD99, anticuerpo anti-CD106, anticuerpo anti-ubiquitina, anticuerpo anti-CD71, anticuerpo anti-c-myc, anticuerpo anti-citoqueratinas, anticuerpo anti-vimentinas, anticuerpo anti-proteínas VPH, anticuerpo anti-cadenas ligeras kappa, anticuerpo anti-cadenas ligeras lambda, anticuerpo anti-melanosomas, anticuerpo anti-antígeno específico de la próstata, anticuerpo anti-S-100, anticuerpo anti-antígeno tau, anticuerpo anti-fibrina, anticuerpo anti-queratinas y anticuerpo anti-antígeno Tn.

(I) Anticuerpos policlonales

En algunos modos de realización, los anticuerpos son anticuerpos policlonales. Los anticuerpos policlonales se incrementan preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con un polipéptido que sea inmunogénico en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de la tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo éster maleimidobenzoilsulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂, o R¹N=C=NR, donde R y R¹ son diferentes grupos alquilo.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 100 µg o 5 µg del polipéptido o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días más tarde se sangran los animales y se determina el suero para el título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta que el título se estanca. En algunos modos de realización, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero se conjugua con un polipéptido diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también pueden hacerse en cultivo celular recombinante como fusiones polipeptídicas. También se usan de forma adecuada agentes agregantes tales como alumbre para mejorar la respuesta inmune.

(ii) *Anticuerpos monoclonales*

En algunos modos de realización, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo a excepción de posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes dichas variantes, en general, en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que no es una mezcla de anticuerpos discretos o policlonales.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar con el procedimiento de hibridoma descrito inicialmente por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden preparar por procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU- n.º 4.816.567).

En el procedimiento de hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, como se describe en el presente documento para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al polipéptido usado para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos se fusionan después con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parental carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

En algunos modos de realización, las células de mieloma son aquellas que se fusionan eficientemente, mantienen una producción de alto nivel estable de anticuerpos por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, en algunos modos de realización, las líneas celulares de mieloma son líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE. UU., y SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE. UU. Se han descrito también las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. En algunos modos de realización, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, estar determinada por el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980).

Después de que se identifican células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitantes y cultivarse mediante procedimientos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, polipéptido A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se puede aislar y secuenciar fácilmente aplicando procedimientos convencionales (por ejemplo, empleando sondas de oligonucleótidos que sean capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). En algunos modos de realización, las células de hibridoma sirven como fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo polipéptido de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256-262 (1993) y Plückerthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

En un modo de realización adicional, se pueden aislar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante barrido de cadena (Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y recombinación in vivo como estrategia para construir Bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación por dominios constantes de cadenas pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81: 6851 (1984)), o uniéndose covalentemente a la secuencia que codifica la inmunoglobulina todo o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido no de inmunoglobulina.

Típicamente, dichos polipéptidos no inmunoglobulínicos son sustituidos por los dominios constantes de un anticuerpo, o son sustituidos por los dominios variables de un sitio de combinación de antígenos de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígenos que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación de antígenos que tiene especificidad para un antígeno diferente.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el anticuerpo es IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal IgG.

(iii) Anticuerpos humanizados

En algunos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos se han descrito en la técnica. En algunos modos de realización, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo residuos de «importación», que típicamente se toman de un dominio variable de «importación». La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986), Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-327 (1988), Verhoeven *et al.*, *Science* 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos «humanizados» son anticuerpos quiméricos (patente de EE. UU. n.º 4.816.567) en los que sustancialmente se ha sustituido menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR se han sustituido por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a utilizar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el denominado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se examina frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana más próxima a la del roedor se acepta entonces como la región estructural humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol* 151: 2296 (1993), Chothia *et al.*, *J. Mol Biol* 196:901 (1987)). Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada. El mismo marco puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151:2623 (1993)).

Es además importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, en algunos modos de realización de los procedimientos, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas muestras permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la

secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias de receptor e importación de manera que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad por el antígeno o los antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia de la unión al antígeno.

(V) Anticuerpos humanos

En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Como una alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanos pueden obtenerse también en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, después de la inmunización, son capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión a la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la disposición genética de la inmunoglobulina a dichos ratones mutantes de línea germinal puede traducirse en la producción de anticuerpos humanos después de la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.* 7:33 (1993); y Patentes de Estados Unidos n.º 5.591.669; 5.589.369; y 5.545.807.

De forma alternativa, se puede usar la tecnología de presentación *en fagos* (McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en marco en un gen polipéptido de recubrimiento mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se muestran como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula fágica. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe dichas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación del fago se puede realizar en una variedad de formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de gen V para la presentación de fagos. Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991) aislaron una diversidad de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos frente a una diversidad de antígenos (incluyendo auto-antígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), o Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.565.332 y 5.573.905.

Los anticuerpos humanos también pueden generarse por células B activadas *in vitro* (véanse las patentes de los Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275).

(v) Fragmentos de anticuerpo

En algunos modos de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ahora ser producidos directamente por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpos discutidas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la materia. En otros modos de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv).

Véase el documento WO 93/16185; Patente de Estados Unidos n.º 5.571.894; y la Patente de Estados Unidos n.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de EE. UU. 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser mono-específicos o bi-específicos.

En algunos modos de realización, se proporcionan fragmentos de los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, el fragmento de anticuerpo es un fragmento de unión al antígeno. En algunos modos de realización, el fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un scFv, un Fv y un diacuerpo.

(vi) Anticuerpos bi-específicos

En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades antigénicas para al menos dos epítomos diferentes. Anticuerpos biespecíficos ejemplo se puede unir a dos epítomos diferentes. Alternativamente, un brazo de unión de anticuerpo biespecífico puede combinarse con un brazo que se une a una molécula disparadora sobre un leucocito tal como una molécula de receptor de células T (p.e. CD2 o CD3), o receptores Fc para IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD 16) para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (p.e. anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Los procedimientos para generar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *Nature* 305:537-539 (1983)). Debido al surtido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos del producto son bajos. Procedimientos similares se describen en el documento WO 93/08829, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. En algunos modos de realización, la fusión es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. En algunos modos de realización, la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presenta en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en modos de realización cuando relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o para las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no son de particular importancia.

En algunos modos de realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones indeseadas de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo la mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se describe en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la Patente de Estados Unidos n.º 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede ser modificada genéticamente para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. En algunos modos de realización, la interfaz comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la (s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, y el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir las células del sistema inmunológico a células no deseadas (Patente de Estados Unidos n.º 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

También se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando un enlace químico. Brennan *et al.*, *Science* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito de sodio para estabilizar los ditiolos vicinales y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-NB se reconvierte entonces al Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del

otro derivado de Fab'-NB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

5 También se han descrito varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al*, *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y luego se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también puede usarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6444 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se ven obligados a acoplarse con los dominios V_H y V_L complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión al antígeno. También se ha descrito otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv(sFv) de cadena sencilla. Véase Gruber *et al*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

20 Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(Vii) Anticuerpos multivalentes

25 En algunos modos de realización, los anticuerpos son anticuerpos multivalentes. Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápidamente que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígenos (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente por expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión al antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión al antígeno amino-terminal a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en el presente documento comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferentemente dos cadenas polipeptídicas), en donde la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la o las cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1) n-VD2- (X2) n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la o las cadenas polipeptídicas pueden comprender: cadena VH-CH1-conector flexible-VH-CH1-región Fc; o cadena VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente de la presente invención comprende preferentemente además al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente invención puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

45 En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico. Ejemplos de anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L), donde la unidad V_HV_L tiene especificidad poliepitópica, anticuerpos que tienen dos o más dominios V_L y V_H con cada unidad V_HV_L unida a un epítipo diferente, anticuerpos que tienen dos o más dominios variables individuales con cada dominio variable único que se une a un epítipo diferente, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fv, DsFv, scFv, diacuerpos, diacuerpos biespecíficos, triacuerpos, anticuerpos trifuncionales, fragmentos de anticuerpos que se han unido covalentemente o no covalentemente. En algunos modos de realización ese anticuerpo tiene especificidad poliepitópica; por ejemplo, la capacidad de unirse específicamente a dos o más epítopos diferentes de la misma diana o de diferentes dianas. En algunos modos de realización, los anticuerpos son monoespecíficos; por ejemplo, un anticuerpo que se une sólo a un epítipo. De acuerdo con un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo IgG1 que se une a cada epítipo con una afinidad de 5 μ M a 0,001 pM, de 3 μ M a 0,001 pM, de 1 μ M a 0,001 pM, de 0,5 μ M a 0,001 pM o de 0,1 μ M a 0,001 pM.

60 (viii) Otras modificaciones de anticuerpos

65 Puede ser deseable modificar el anticuerpo proporcionado en el presente documento con respecto a la función efectora, por ejemplo, para aumentar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, se pueden introducir restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El

anticuerpo homodimérico así generado puede tener capacidad mejorada de internalización y/o aumento de la muerte celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Véase Caron et al., *J. Exp. Med.* 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, *B.J., Immunol.* 148:2918-2922 (1992). También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral mejorada utilizando agentes de reticulación heterobifuncionales como se describe en Wolff et al., *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y puede por lo tanto tener una capacidad mejorada de lisis mediada por complemento y ADCC. Véase Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219 - 230 (1989).

Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se pueden hacer alteraciones de aminoácidos en el anticuerpo como se describe en el documento US 2006/0067930, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

(B) Variantes y modificaciones de polipéptidos

La modificación o modificaciones de secuencia de aminoácidos de los polipéptidos, incluyendo anticuerpos, descritos en el presente documento, se pueden usar en los procedimientos de purificación de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) descritos en el presente documento.

(i) Polipéptidos Variantes

"Variante de polipéptido" significa un polipéptido, preferentemente un polipéptido activo, como se define en el presente documento que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia nativa de longitud completa del polipéptido, una secuencia polipeptídica que carece del péptido señal, un dominio extracelular de un polipéptido, con o sin el péptido señal. Dichas variantes de polipéptidos incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que uno o más residuos de aminoácidos se añaden o eliminan en el extremo N o C terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Normalmente, una variante de polipéptido TAT tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, de forma alternativa al menos aproximadamente cualquiera de un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia polipeptídica de secuencia nativa de longitud completa, una secuencia polipeptídica que carece del péptido señal, un dominio extracelular de un polipéptido, con o sin el péptido señal. Opcionalmente, los polipéptidos variantes no tendrán más de una sustitución conservativa de aminoácidos en comparación con la secuencia polipeptídica nativa, alternativamente no más de aproximadamente cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 sustituciones de aminoácidos conservativos en comparación con la secuencia polipeptídica nativa.

El polipéptido variante puede estar truncado en el extremo N terminal o en el extremo C terminal, o puede carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se compara con un polipéptido nativo de longitud completa. Ciertos polipéptidos variantes pueden carecer de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada. Estos polipéptidos variantes con truncamientos, deleciones e inserciones pueden prepararse por cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Los polipéptidos variantes deseados pueden sintetizarse químicamente. Otra técnica adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido variante deseado, por reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Los oligonucleótidos que definen los extremos terminales deseados del fragmento de ácido nucleico se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferentemente, los polipéptidos variantes comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido nativo descrito en el presente documento.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones de extremo amino y/o carboxilo terminales que varían en longitud de un resto respecto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones dentro la secuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión en el extremo N o C terminal del anticuerpo con una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del polipéptido. Las variantes de secuencia de aminoácidos del polipéptido se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones y/o inserciones y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del polipéptido. Se puede hacer cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del polipéptido (por ejemplo, anticuerpo), tales como cambiar el número o posición de sitios de glucosilación.

La orientación para determinar qué residuo de aminoácido puede ser insertado, sustituido o suprimido sin afectar negativamente a la actividad deseada se puede encontrar comparando la secuencia del polipéptido con la de moléculas polipeptídicas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios de secuencia de aminoácidos realizados en regiones de alta homología.

Un procedimiento útil para la identificación de ciertos restos o regiones del polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe en Cunningham y Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989). En el presente documento, un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) se identifican y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas posiciones de aminoácidos que demuestran la sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan entonces introduciendo otras u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita ser predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza un escaneo ala o una mutagénesis aleatoria en el codón o región objetivo y se seleccionan las variantes de anticuerpo expresadas para la actividad deseada.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitutiva incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones resultan en un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplo" en la tabla 1, o como se describe adicionalmente más adelante con referencia a las clases de aminoácidos, y se examinan los productos.

Tabla 1.

Resto original	Sustituciones ejemplo	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Se realizan modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del polipéptido seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en mantener (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en forma de hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse según similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en AL Lehninger, *Biochemistry*, segunda edición, págs. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

(1) no polar: Al (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polar sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácido: Asp (D), Glu (E)

(4) básico: Lys (K), Arg (R), His (H)

5 Alternativamente, los residuos naturales se pueden dividir en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

10 (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gin;

(3) Ácidos: Asp, Glu;

15 (4) Básicos: His, Lys, Arg;

(5) Restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

20 Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína que no esté implicado en mantener la conformación apropiada del anticuerpo también puede estar sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. Por el contrario, se pueden añadir enlaces cisteína al polipéptido para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado). Generalmente, la o las variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental del que se generan. Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución usa la presentación en fagos. Brevemente, diversos sitios de la región hiperavariada (por ejemplo, 6-7 sitios) son mutados para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se presentan de una manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. *Las variantes presentadas en fagos se criban entonces por su actividad biológica* (por ejemplo, afinidad de unión) como se describe en el presente documento. Para identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para su modificación, se puede realizar una mutagénesis de barrido de alanina para identificar los restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. De forma alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y la diana. Dichos restos de contacto y los restos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en el presente documento y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para un mayor desarrollo.

Otro tipo de variante de aminoácidos del polipéptido altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. El polipéptido puede comprender restos no aminoácidos. Por ejemplo, el polipéptido puede estar glicosilado. Dicha glicosilación puede ocurrir naturalmente durante la expresión del polipéptido en la célula huésped o en el organismo huésped, o puede ser una modificación deliberada que surja de la intervención humana. Por alteración se entiende suprimir uno o más restos de hidratos de carbono encontrados en el polipéptido, y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el polipéptido.

La glicosilación del polipéptido está típicamente unida a N o unida a O. Unido a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripeptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxirolina o 5-hidroxisilina.

La adición de sitios de glicosilación al polipéptido se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos tal que contiene una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración puede realizarse también mediante la adición o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O).

La eliminación de los restos de carbohidratos presentes en el polipéptido puede realizarse químicamente o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican restos de aminoácidos que sirven como

dianas para la glicosilación. La escisión enzimática de restos de carbohidratos en polipéptidos se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glicosidasas.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de restos glutamilo y asparaginilo a los correspondientes restos glutamilo y aspartilo, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, metilación de grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina, andhistidina, acetilación de la amina del extremo N terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo del extremo C terminal.

(ii) *Polipéptidos quiméricos*

El polipéptido descrito en el presente documento puede ser modificado de manera que forme moléculas quiméricas que comprenden el polipéptido fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogo. En algunos modos de realización, una molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que un anticuerpo anti-etiqueta puede unirse selectivamente. La etiqueta del epítipo se coloca generalmente en el extremo amino o carboxilo terminal del polipéptido. La presencia de tales formas etiquetadas con epítipo del polipéptido se puede detectar usando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la provisión de la etiqueta de epítipo permite que el polipéptido se purifique fácilmente por purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se una a la etiqueta de epítipo.

En un modo de realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del polipéptido con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Una forma bivalente de la molécula quimérica se denomina "inmunoadhesina".

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de un polipéptido heterólogo con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del reconocimiento antigénico y sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina es típicamente una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de una forma soluble (dominio suprimido o inactivado de la transmembrana) de un polipéptido en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En un modo de realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH₂ and CH₃, o las regiones bisagra, CH₁, CH₂ y CH₃ de una molécula de IgG1.

(iii) *Conjugados polipeptídicos*

El polipéptido para uso en formulaciones de polipéptidos puede conjugarse con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Pueden usarse agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales conjugados. Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de la difteria, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Una variedad de radionucleidos están disponibles para la producción de polipéptidos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Se preparan conjugados del polipéptido y del agente citotóxico usando una variedad de agentes bifuncionales de acoplamiento de proteínas tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como clorhidrato de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis-(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar según se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ejemplo para la conjugación de radionucleótidos al polipéptido.

Los conjugados de un polipéptido y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan en el presente documento.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del Este de África *Maytenus serrata*. Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol. También se contemplan el maytansinol sintético y sus derivados y análogos. Existen muchos grupos de unión conocidos en la técnica para la preparación de conjugados polipéptido-maytansinoida, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la Patente de EE. UU. n.º 5.208.020. Los grupos de unión incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas o grupos lábiles a esterasas, tal como se divulgan en las patentes identificadas anteriormente, siendo preferentes los grupos disulfuro y tioéter.

El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, se puede formar un enlace éster por reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción se puede producir en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, en la posición C-14 modificada con hidroximetilo, en la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En un modo de realización preferente, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o un análogo de maitansinol.

Otro conjugado de interés comprende un polipéptido conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. Los antibióticos de la familia de las caliqueamicinas son capaces de producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina, véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. n.º 5.712.374. Los análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 . Otro fármaco anti-tumoral que se puede conjugar con el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes mediante internalización mediada por polipéptido (p.e. anticuerpo) mejora enormemente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes anti-tumorales que se pueden conjugar con los polipéptidos de la invención incluyen BCNU, estreptozaocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 así como esperamicinas.

En algunos modos de realización el polipéptido puede ser un conjugado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa; ADNsa).

En otra realización más, el polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) se puede conjugar con un "receptor" (tal como estreptavidina) para usarse en el marcado de un tumor, en el que el conjugado polipéptido-receptor se administra al individuo, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente de aclaramiento y, a continuación la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

En algunos modos de realización, el polipéptido puede conjugarse con una enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptidílico) en un fármaco anticanceroso activo. El componente enzimático del inmunconjugado incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal manera que lo encubra en su forma citotóxica más activa.

Las enzimas que son útiles incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosinadesaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteasas tales como serratiaproteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácidos; enzimas que escinden carbohidratos tales como β -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para la conversión de fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilinaamidasa, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amínicos con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. De forma alternativa, pueden usarse anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", para convertir los profármacos en fármacos activos libres.

(iv) Otros

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido comprende la unión del polipéptido a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El polipéptido también se puede atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmelacrilato), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en

macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a edición, Gennaro, A.R., Ed., (1990).

IV. Obtención de polipéptidos para su uso en las formulaciones y procedimientos

Los polipéptidos usados en los procedimientos de purificación descritos en el presente documento se pueden obtener usando procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo los procedimientos de recombinación. Las siguientes secciones proporcionan orientación sobre estos procedimientos.

(A) Polinucleótidos

"Polinucleótido", o "ácido nucleico", como se usa indistintamente en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN.

Los polinucleótidos que codifican polipéptidos pueden obtenerse a partir de cualquier fuente incluyendo, pero sin limitarse a, una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree posee el ARNm del polipéptido y para expresarlo a un nivel detectable. Por consiguiente, los polinucleótidos que codifican el polipéptido se pueden obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el polipéptido también puede obtenerse a partir de una biblioteca genómica o mediante procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis automatizada de ácido nucleico).

Por ejemplo, el polinucleótido puede codificar una cadena de molécula de inmunoglobulina entera, tal como una cadena ligera o una cadena pesada. Una cadena pesada completa incluye no sólo una región variable de cadena pesada (V_H) sino también una región constante de cadena pesada (C_H), que típicamente comprenderá tres dominios constantes: C_{H1} , C_{H2} Y C_{H3} ; y una región de bisagra. En algunas situaciones, la presencia de una región constante es deseable.

Otros polipéptidos que pueden ser codificados por el polinucleótido incluyen fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos tales como anticuerpos de dominio único ("dAbs"), Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂ y "minicuerpos". Los minicuerpos son (típicamente) fragmentos de anticuerpos bivalentes a partir de los cuales se ha extirpado el dominio C_{H1} y C_K o C_L . Debido a que los minicuerpos son más pequeños que los anticuerpos convencionales, deberían lograr una mejor penetración de tejido en el uso clínico/diagnóstico, pero siendo bivalentes deberían retener mayor afinidad de unión que los fragmentos de anticuerpos monovalentes, tales como dAbs. Por consiguiente, a menos que el contexto lo indique de otra manera, el término "anticuerpo" tal como se usa en la presente invención abarca no sólo moléculas de anticuerpo entero sino también fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos del tipo discutido anteriormente. Preferentemente, cada región estructural presente en el polipéptido codificado comprenderá al menos una sustitución de aminoácidos con respecto al marco aceptor humano correspondiente. Así, por ejemplo, las regiones estructurales pueden comprender, en total, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, o quince sustituciones de aminoácidos con respecto a las regiones estructuralesceptoras.

Convenientemente, los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden aislarse y/o purificarse. En algunos modos de realización, los polinucleótidos son polinucleótidos aislados.

El término «polinucleótido aislado» pretende indicar que la molécula se elimina o se separa de su entorno normal o natural o se ha producido de tal manera que no está presente en su entorno normal o natural. En algunos modos de realización, los polinucleótidos son polinucleótidos purificados. El término purificado pretende indicar que al menos algunas moléculas o sustancias contaminantes han sido eliminadas.

De manera adecuada, los polinucleótidos están sustancialmente purificados, de tal manera que los polinucleótidos relevantes constituyen los polinucleótidos dominantes (es decir, más abundantes) presentes en una composición.

(B) Expresión de polinucleótidos

La descripción que sigue se refiere principalmente a la producción de polipéptidos cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene polinucleótidos que codifican polipéptidos. Se contempla, por supuesto, que se pueden emplear procedimientos alternativos, que son bien conocidos en la técnica, para preparar polipéptidos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o partes de la misma, puede producirse por síntesis directa de péptidos usando técnicas de fase sólida (véase, por ejemplo, Stewart *et al.*, *Solid-Phase Peptide Synthesis* WH Freeman Co., San Francisco, California (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154 (1963)). Se puede realizar la síntesis de proteínas usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede realizarse, por ejemplo, usando un Sintetizador de Péptidos Applied Biosystems (Foster City, California) usando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar varias partes del polipéptido químicamente por separado y combinar usando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el polipéptido deseado.

Los polinucleótidos como se describen en el presente documento se insertan en un vector o vectores de expresión para la producción de los polipéptidos. El término "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación unida operativamente en un organismo huésped particular. Las

secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, promotores (por ejemplo, promotores asociados de forma natural o heterólogos), secuencias señal, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción.

Un ácido nucleico se "une de manera funcional" cuando se dispone en una relación funcional con otra secuencia de polinucleótidos. Por ejemplo, ácidos nucleicos para una presecuencia o secuencia líder secretora está unido operativamente a ácidos nucleicos para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia de codificación si está posicionado de manera que facilite la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ácido nucleico que están unidas son contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, que son contiguas y están en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se consigue mediante ligadura a sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, los adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos se usan de acuerdo con la práctica convencional.

Para anticuerpos, las cadenas ligera y pesada pueden clonarse en el mismo o en diferentes vectores de expresión. Los segmentos de ácido nucleico que codifican las cadenas de inmunoglobulina están unidos operativamente a secuencias de control en el vector o vectores de expresión que aseguran la expresión de polipéptidos de inmunoglobulina.

Los vectores que contienen las secuencias polinucleotídicas (por ejemplo, las secuencias de codificación de cadenas ligeras pesadas y/o variables y las secuencias de control de expresión opcionales) se pueden transferir a una célula huésped por procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección de cloruro de calcio se usa comúnmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, biolística o transfección basada en virus se puede usar para otros huéspedes celulares. (Véase, por ejemplo, *Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 2ª edición, 1989). Otros procedimientos usados para transformar células de mamíferos incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y microinyección. Para la producción de animales transgénicos, los transgenes pueden ser microinyectados en oocitos fertilizados, o pueden ser incorporados en el genoma de células madre embrionarias, y los núcleos de tales células se transfieren a oocitos enucleados.

(C) Vectores

El término "vector" incluye vectores de expresión y vectores de transformación y vectores lanzadera.

El término "vector de expresión" significa un constructo capaz de expresión *in vivo* o *in vitro*.

El término "vector de transformación" significa un constructo capaz de ser transferido de una entidad a otra entidad - que puede ser de la especie o puede ser de una especie diferente. Si el constructo es capaz de ser transferido de una especie a otra, tal como de un plásmido de *Escherichia coli* a una bacteria, tal como del género *Bacillus*, entonces el vector de transformación se denomina a veces "vector lanzadera". Puede incluso ser un constructo capaz de ser transferido de un plásmido de *E. coli* a un *Agrobacterium* a una planta.

Los vectores pueden transformarse en una célula huésped adecuada como se describe a continuación para proporcionar la expresión de un polipéptido. Varios vectores se encuentran disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados usando técnicas conocidas en la técnica. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligadura convencionales que son conocidas por el experto en la técnica.

Los vectores pueden ser, por ejemplo, vectores de plásmidos, virus o fagos provistos de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de dicho polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables que son bien conocidos en la técnica.

Estos vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos huésped bien como episomas o como parte integral del ADN cromosómico del huésped.

(D) Células huésped

La célula huésped puede ser una bacteria, una levadura u otra célula fúngica, célula de insecto, una célula de planta, o una célula de mamífero, por ejemplo.

Se puede usar un organismo huésped multicelular transgénico que ha sido manipulado genéticamente para producir un polipéptido. El organismo puede ser, por ejemplo, un organismo transgénico de mamífero (por ejemplo, una línea transgénica de cabra o ratón).

Los procariotas adecuados incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gramnegativos o Grampositivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *E. coli*. Varias cepas de *E. coli* están disponibles al público, tales como cepa MM294 de *E. coli* K12 (ATCC 31.446); X1776 de *E. coli* (ATCC 31.537); cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células huésped procariotas adecuadas incluyen *Enterobacteriaceae* tales como Escherichia, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como Bacillos tales como *B. Subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. La cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferido porque es una cepa huésped común para fermentaciones de producto de polinucleótido recombinante. Preferentemente, la célula huésped segrega cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para efectuar una mutación genética en los genes que codifican los polipéptidos endógenos para el huésped, con ejemplos de tales huéspedes incluyendo cepa 1A2 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo tonA; *E. coli* W3110 cepa 9E4, que tiene el genotipo completo tonA ptr3; cepa 27C7 de *E. coli* W3110 (ATCC 55,244), que tiene el genotipo completo tonA ptr3phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompTkan'; cepa 37D6 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan'; cepa 40B4 de *E. coli* W3110, que es la cepa 37D6 con una mutación de supresión degP no resistente a la kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante. De forma alternativa, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de polimerasa de ácido nucleico.

En estos huéspedes procariotas, se pueden hacer vectores de expresión, los cuales típicamente contienen secuencias de control de expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estarán presentes cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (trp), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor a partir de fago lambda. Los promotores controlarán típicamente la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tendrán secuencias de sitios de unión al ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción.

Los microbios eucariotas se pueden usar para la expresión. Los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariota inferior comúnmente usado. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de Kluyveromyces tales como, por ejemplo, *K. Lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris*; *Candida*; *Trichoderma reesia*; *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, huéspedes *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyocladium*, y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Las levaduras metilotrópicas son adecuadas en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, levaduras capaces de crecer sobre metanol seleccionado de los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. *Saccharomyces* es un huésped de levadura preferido, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de expresión (por ejemplo, promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares como se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isociocromo C y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

Además de microorganismos, el cultivo de células de tejido de mamífero también puede usarse para expresar y producir los polipéptidos como se describe en el presente documento y en algunos casos se prefieren (véase Winnacker, *From Genes to Clones* VCH Publishers, NY, NY (1987)). Para algunos modos de realización, se pueden preferir células eucariotas, porque se han desarrollado en la técnica varias líneas celulares huésped adecuadas capaces de segregar polipéptidos heterólogos (por ejemplo, inmunoglobulinas intactas), e incluyen líneas celulares CHO, diversas líneas celulares Cos, células HeLa, preferentemente, líneas celulares de mieloma, o células B transformadas o hibridomas. En algunos modos de realización, la célula huésped de mamífero es una célula CHO.

En algunos modos de realización, la célula huésped es una célula huésped de vertebrado. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero incluyen líneas VC1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (línea CHO o CHO-DP-12); células de Sertoli de ratón; células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1; células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

V. Formulaciones y procedimientos de producción de las formulaciones

En el presente documento también se proporcionan formulaciones y procedimientos para preparar la formulación que comprende los polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) purificada mediante los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, el polipéptido purificado puede combinarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las formulaciones de polipéptido en algunos modos de realización se pueden preparar para almacenamiento mezclando un polipéptido que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (*Remington Pharmaceutical Sciences*, 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

«Vehículos» tal como se usa en el presente documento incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o mamífero que está expuesto a los mismos en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Frecuentemente el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada en pH.

Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los destinatarios a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

En algunos modos de realización, el polipéptido en la formulación de polipéptido mantiene la actividad funcional.

Las formulaciones que se vayan a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no resultan afectadas de manera adversa entre sí. Por ejemplo, además de un polipéptido, puede ser deseable incluir en la formulación un polipéptido adicional (por ejemplo, un anticuerpo). Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, una citocina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antihormonal y/o un cardioprotector. Tales moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

H. Artículos de fabricación

Los polipéptidos purificados por los procedimientos descritos en el presente documento y/o formulaciones que comprenden los polipéptidos purificados por los procedimientos descritos en la presente memoria pueden estar contenidos dentro de un artículo de fabricación. El artículo de fabricación puede comprender un recipiente que contiene el polipéptido y/o la formulación de polipéptido. preferentemente, el artículo de fabricación comprende: (a) un recipiente que comprende una composición que comprende el polipéptido y/o la formulación de polipéptido en el presente documento descrita dentro del recipiente; y (b) un inserto de paquete con instrucciones para administrar la formulación a un sujeto.

El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes se pueden obtener en una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente aloja o contiene una formulación y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es el polipéptido. La etiqueta o prospecto indica el uso de la composición en un sujeto con directrices específicas en lo referente a las cantidades de dosificación y los intervalos de polipéptido y cualquier otro fármaco que se proporcione. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas. En algunos modos de realización, el dispositivo es una jeringuilla. En algunos modos de realización, la jeringuilla está además contenida dentro de un dispositivo de inyección. En algunos modos de realización, el dispositivo de inyección es un autoinyector.

El término "prospecto" se usa para hacer referencia a las instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones, otros productos terapéuticos que se van a combinar con el producto envasado y/o advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos.

VI. Modos de realización ejemplares

En algunos modos de realización, la invención proporciona procedimientos para purificar un polipéptido a partir de una composición que comprende el polipéptido y uno o más contaminantes, comprendiendo dicho procedimiento a) cargar la

- composición en un modo mixto, un intercambio aniónico, una interacción hidrófoba o un material de cromatografía de afinidad en 20 veces la capacidad de unión dinámica del material de cromatografía para el polipéptido usando un tampón de carga, donde el coeficiente de reparto del material de cromatografía para el polipéptido es mayor que 30, b) eluyendo el polipéptido del material de cromatografía en condiciones en las que el uno o más contaminantes permanecen unidos al material de cromatografía usando un tampón de elución, en el que el tampón de elución tiene una conductividad menor que la conductividad del tampón de carga y c) agrupación de fracciones que comprenden el polipéptido en el efluente de cromatografía de las etapas a) y b).
- 5
- En otros modos de realización de la realización anterior, el polipéptido es un anticuerpo o inmunoadhesina.
- 10
- En otros modos de realización de la realización anterior, el polipéptido es una inmunoadhesina.
- En otros modos de realización de la realización anterior, el polipéptido es un anticuerpo.
- 15
- En otros modos de realización de la realización anterior, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- En aún otra realización de la realización anterior, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 20
- En otros modos de realización de la realización anterior, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal IgG.
- En otros modos de realización de la realización anterior, el anticuerpo es un fragmento de unión al antígeno.
- En otros modos de realización adicionales de la realización anterior, el fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un scFv, un di-scFv, un bi-scFv, un tándem (di, tri)-scFv, un Fv, un sdAb, un anticuerpo trifuncional, un BiTE, un diacuerpo y un triacuerpo.
- 25
- En otros modos de realización de la realización anterior, el polipéptido se selecciona de una enzima, una hormona, una proteína de fusión, una proteína que contiene Fc, un inmunoconjugado, una citocina y una interleucina.
- 30
- En otros modos de realización de la realización anterior, el por lo menos un contaminante es uno o más proteínas de ovario de hámster chino (CHOP), una proteína de célula huésped (HCP), proteína A lixiviada, carboxipeptidasa B, ácido nucleico, ADN, variantes de producto, proteína agregada, componente de medio de cultivo celular, gentamicina, fragmento polipeptídico, endotoxina y contaminante viral.
- 35
- En otras adicionales de la realización anterior, el material de cromatografía se selecciona de un material de modo mixto, un material de intercambio aniónico, un material de intercambio catiónico, un material de interacción hidrofóbico y un material de afinidad.
- 40
- En otros modos de realización de la realización anterior, la densidad de carga está entre aproximadamente 50 g/l y aproximadamente 2000 g/l.
- Aún en otros modos de realización de la realización anterior; la densidad de carga está entre aproximadamente 200 g/l y aproximadamente 1000 g/l.
- 45
- En otros modos de realización de la realización anterior, la composición se carga sobre el material de cromatografía a aproximadamente las capacidades de unión dinámica de los materiales de cromatografía para uno o más contaminantes.
- 50
- En otros modos de realización de la realización anterior, la composición se carga sobre el material de cromatografía a 20 veces la capacidad de unión dinámica del material de cromatografía para el polipéptido.
- En otros modos de realización de la realización anterior, el coeficiente de reparto del material de cromatografía para el polipéptido es mayor que 30.
- 55
- En otros modos de realización de la realización anterior, el coeficiente de reparto del material de cromatografía para el polipéptido es mayor que 100.
- 60
- En otros modos de realización de la realización anterior, el procedimiento comprende además el uso de un tampón de carga y un tampón de elución.
- En otros modos de realización de la realización anterior, el tampón de elución tiene una conductividad menor que la conductividad del tampón de carga.
- 65
- En otros modos de realización de la realización anterior, el tampón de carga tiene una conductividad de aproximadamente 4,0 mS a aproximadamente 7,0 mS.

- En otros modos de realización de la realización anterior, el tampón de elución tiene una conductividad de aproximadamente 0,0 mS a aproximadamente 7,0 mS.
- 5 En otros modos de realización de la realización anterior, el tampón de elución tiene una conductividad mayor que la conductividad del tampón de carga.
- En otros modos de realización de la realización anterior, el tampón de carga tiene una conductividad de aproximadamente 4,0 mS a aproximadamente 7,0 mS.
- 10 En otros modos de realización de la realización anterior, el tampón de elución tiene una conductividad de aproximadamente 5,5 mS a aproximadamente 17,0 mS.
- 15 En otros modos de realización de la realización anterior, la conductividad del tampón de elución disminuye en un gradiente de aproximadamente 5,5 mS a aproximadamente 1,0 mS sobre aproximadamente 10 volúmenes de columna (VC).
- En otros modos de realización de la realización anterior, la conductividad del tampón de elución disminuye en un gradiente de aproximadamente 5,5 mS a aproximadamente 1,0 mS durante aproximadamente 15 VC.
- 20 En otros modos de realización de la realización anterior, la conductividad del tampón de elución disminuye en un gradiente de aproximadamente 10,0 mS a aproximadamente 1,0 mS durante aproximadamente 5 VC.
- 25 En otros modos de realización de la realización anterior, la conductividad del tampón de elución disminuye en un gradiente de aproximadamente 10,9 mS a aproximadamente 1,0 mS durante aproximadamente 10 VC.
- En otros modos de realización de la realización anterior, el tampón de elución tiene un pH menor que el pH del tampón de carga.
- 30 En otros modos de realización de la realización anterior, el tampón de carga tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9.
- En otros modos de realización de la realización anterior, el tampón de elución tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9.
- 35 En otros modos de realización de la realización anterior, el tampón de elución tiene un pH mayor que el pH del tampón de carga.
- En otros modos de realización de la realización anterior, el tampón de carga tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9.
- 40 En otros modos de realización de la realización anterior, el tampón de elución tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9.
- 45 En otros modos de realización de la realización anterior, la composición es un eluyente de una cromatografía de afinidad, una cromatografía de intercambio catiónico, una cromatografía de intercambio aniónico, una cromatografía de modo mixto y una cromatografía de interacción hidrófoba.
- 50 En otros modos de realización de la realización anterior, la cromatografía de afinidad es una cromatografía de Proteína A.
- En otros modos de realización de la realización anterior, el polipéptido se purifica adicionalmente.
- 55 En otros modos de realización adicionales de la realización anterior, el polipéptido se purifica adicionalmente mediante filtración de virus.
- En otros modos de realización adicionales de la realización anterior, el polipéptido se purifica adicionalmente mediante una o más de una cromatografía de afinidad, una cromatografía de intercambio catiónico, una cromatografía de intercambio aniónico, una cromatografía de modo mixto o una cromatografía de interacción hidrófoba.
- 60 En otros modos de realización de la realización anterior, el polipéptido se concentra adicionalmente.
- Aún en otros modos de realización de la realización anterior, el polipéptido se concentra por ultrafiltración, diafiltración o una combinación de ultrafiltración y diafiltración.
- 65

En otros modos de realización de la realización anterior, los procedimientos comprenden además la combinación del polipéptido con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos

5

Los ejemplos que siguen están destinados a ser puramente ejemplares de la invención y, por lo tanto, no deben considerarse limitativos de la invención en modo alguno. Los siguientes ejemplos y descripción detallada se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

10 **Materiales y procedimientos**

Los materiales y procedimientos para todos los ejemplos se realizaron como se indica a continuación a menos que se indique lo contrario en el Ejemplo.

15 *Alimentación de MAb*

La alimentación de MAb para todos los ejemplos se seleccionó de lotes de cultivo celular a escala industriales, piloto o de pequeña escala en Genentech (South San Francisco, CA, EE. UU.). Después de un período de fermentación del cultivo celular, las células se separaron y el líquido clarificado se purificó mediante cromatografía de Proteína A. La proteína A se usó para investigar el mecanismo de eliminación de impurezas. La tabla 2 muestra las características de la alimentación para cada mAb usado en los ejemplos.

20

Tabla 2 Características de la alimentación de MAb.

MAB	MAB Identificación	pI
MAB 1	Rituxan [®]	8,8-9,3
MAB 2	Anti-oxLDL	9,3
MAB 3	Anti-ALK α	8,7
MAB 4	Xolair [®]	7,6
MAB 5	Anti-FGFR3	8,1

25

Cuantificación del MAB

La concentración de anticuerpo se determinó mediante absorbancia a 280 y 320 nm usando un espectrofotómetro UV-visible (modelo 8453 G1103A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) o NanoDrop 1000 modelo ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Especies distintas del anticuerpo (es decir, impurezas) eran demasiado bajas en concentración para tener un efecto apreciable sobre la absorbancia UV. Cuando era necesario, las muestras se diluyeron con un diluyente no interferente apropiado en el intervalo de 0,1–1,0 unidad de absorbancia. La preparación de la muestra y las mediciones UV se realizaron por duplicado y se registró el valor medio. Los coeficientes de absorción de MAB oscilaron entre 1,42 y 1,645/mg·ml·cm.

30

35

Cuantificación de la proteína de la célula huésped CHO (CHOP)

Se usó un ELISA para cuantificar los niveles de la proteína de la célula huésped llamada CHOP. Los anticuerpos anti-CHOP se inmovilizaron en pocillos de placas de microtitulación. Las diluciones de las muestras que contenían CHOP, patrones y controles se incubaron en los pocillos, seguido de incubación con anticuerpos anti-CHOP conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP). La actividad enzimática de HRP se detectó con o-fenilendiamina, y el CHOP se cuantificó por lectura de la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de microtitulación. Basándose en los principios de ELISA en sándwich, la concentración de peroxidasa correspondía a la concentración de CHOP. El intervalo de ensayo para el ELISA era típicamente 5-320 ng/ml con variabilidad intra-ensayo <10 %. Los valores de CHOP se informaron en unidades de ng/ml. Alternativamente, los valores de CHOP se dividieron por la concentración de MAb y los resultados se informaron en PPM (partes por millón, por ejemplo, ng de CHOP/mg de MAb). El ELISA de CHOP se puede usar para cuantificar los niveles totales de CHOP en una muestra, pero no cuantifica la concentración de proteínas individuales.

50

Condiciones de funcionamiento de cromatografía

Las resinas Capto Adhere y Capto MMC Capto Adhere se adquirieron en GE Healthcare (Uppsala, Suecia). Se adquirieron resinas de intercambio catiónico fuertes (Poros XS y Poros 50 HS) en Applied Biosystems (Address). Todos los experimentos de cromatografía de laboratorio se llevaron a cabo usando un sistema cromatográfico AKLC FPLC de GE Healthcare (Uppsala, Suecia) usando el software UNICORN. Las columnas de laboratorio tenían 0,66 cm de diámetro y 10-20 cm de altura. Las columnas se equilibraron a las condiciones de funcionamiento especificadas de pH y conductividad antes de la carga. A continuación, las agrupaciones de proteína A se cargaron en la columna seguido por

55

el tampón de elución según se requiera para eluir la proteína unida. El flujo o eluido durante la carga, la sobrecarga y las fases de elución se recogieron como fracciones y después se analizaron las impurezas. La densidad de carga del MAb variaba de 100 a 1000 g por litro de resina.

5 *Análisis de la agrupación cromatográfica*

Las agrupaciones de flujo durante la carga, la sobrecarga y las fases de elución se recogieron en fracciones (1 volumen de columna cada una) y se analizaron para determinar la concentración de MAb, la concentración de CHOP, los agregados, la proteína A lixiviada, el ADN de CHO y el rendimiento. Se generaron gráficos acumulativos en función de las fracciones de la agrupación de elución. El rendimiento acumulativo se obtuvo usando la Ecuación 1.

donde, para la fracción i , C_i es la concentración de Mab (mg/ml), V_i es el volumen de la fracción (ml), M_p es la masa de proteína cargada (mg).

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\sum_{i=1}^y C_i * V_i}{M_p} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

15

Cromatografía de exclusión molecular

La heterogeneidad de tamaño de los anticuerpos monoclonales se determinó mediante un ensayo de cromatografía de exclusión molecular de alta resolución. Una columna TSK G3000SWXL SEC (diámetro = 7,8 mm, altura = 300 mm, número de referencia 08541) fabricada por Tosoh Bioscience (Tokio, Japón) se operó a temperatura ambiente en un equipo de HPLC de la serie 1200 (Agilent Technologies) y se usó para determinar la relación de niveles de monómero de MAb para las muestras recogidas. La columna se operó a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min usando una fase móvil de fosfato de potasio 200 mM, fase móvil de cloruro de potasio 250 mM a pH 6,2. Se inyectó 20 µg de anticuerpo para cada muestra. Se usó absorbancia UV a 280 nm para monitorizar la separación de monómeros, proteínas LMW y proteínas HMW. Los porcentajes de monómero, proteínas LMW y proteínas HMW se analizaron manualmente utilizando el software ChemStation (Agilent Technologies).

30 *Cuantificación de ADN de CHO*

El ADN de CHO en muestras de producto se cuantificó usando PCR a tiempo real (TaqMan PCR). El ADN de las muestras y los controles se extrajeron primero usando el kit Qiagen Virus Biorobot. Las muestras extraídas, los controles y el ADN estándar, fueron sometidos a reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real TaqMan (PCR) usando cebadores de PCR y sonda en una placa de 96 pocillos con el sistema de detección de secuencias de ABI. Los cebadores se definieron por un segmento de 110 pares de bases de una secuencia de ADN repetitiva en el genoma de *Cricetulus griseus*. La sonda se etiquetó con un colorante reportero fluorescente en el extremo 5' y un colorante de extinción en el extremo 3'. Cuando la sonda está intacta, el espectro de emisión del reportero es suprimido por el extintor. La actividad 5' nucleasa de la polimerasa hidroliza la sonda y libera el reporte, lo que da como resultado un aumento en la emisión de fluorescencia. El detector de secuencia cuantificó el producto amplificado en proporción directa con el aumento de la emisión de fluorescencia medida continuamente durante la amplificación del ADN. Los números de ciclo en los que el ADN se había amplificado más allá del umbral (CT) se calcularon para la curva estándar. Se generó una curva estándar de 1 pg/ml-10 000 pg/ml, que se utilizó para cuantificar ADN en muestras.

45 *Cuantificación de Proteína A lixiviada*

El nivel de Proteína A lixiviada en las agrupaciones de Proteína A se determinó mediante un ELISA en sándwich de Proteína-A. Los anticuerpos de la proteína A anti-estafilocócica de pollo se inmovilizaron en pocillos de placas de microtitulación. El procedimiento de tratamiento de la muestra incluyó la dilución de la muestra y luego la disociación del complejo de Proteína A/IgG usando calentamiento asistido por microondas como una etapa de pretratamiento antes de ejecutar las muestras en un ELISA sandwich. La proteína A, si está presente en la muestra, se une al anticuerpo recubierto. La proteína A unida se detectó usando anticuerpos anti-proteína conjugados con peroxidasa de rábano picante. La actividad enzimática de la peroxidasa de rábano picante se cuantificó con una solución de sustrato TMB de 2 componentes que produce una señal colorimétrica.

55 *Acondicionamiento de la alimentación*

Las alimentaciones usadas para los experimentos en este estudio fueron frescas o se retiraron del almacenamiento en frío (2–8 °C o –70 °C) y se dejó equilibrar a temperatura ambiente. Posteriormente, se ajustaron el pH y/o la conductividad según se necesitaba usando un agente de titulación (base Tris 1,5 M o ácido acético 1 M) o diluyente (agua purificada, cloruro de sodio 5 M o acetato de sodio 5 M). Todas las alimentaciones fueron de 0,2 µ M filtrado

60

usando un Millipak 20 (Millipore), AcroPak™ 20 (Pall Corporation) o un filtro de vacío (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, EE. UU.).

Cribado de alto rendimiento

5 Se utilizó un robot Tecan Freedom Evo 200 (Tecan US, Research Triangle Park, NC) para el manejo de líquidos y resinas. Se usó una placa de filtro de 96 pocillos (Seahorse 800 μ l de polipropileno de 0,45 μ m, E & K Scientific EK-2223) para incubar la resina con la proteína y el tampón. Después de incubar la solución de proteína con la resina, la placa de filtro se centrifugó a 1200 xg durante 3 minutos para separar la solución de la resina. Para cada etapa, se pusieron en contacto 300 ml de solución con 50 ml de resina, dando como resultado una relación en volumen de fase de 6:1. Cada pocillo se equilibró hasta el pH apropiado y la concentración de acetato de sodio. El pH variaba de 5,00 a 7,5 a intervalos de 0,5 unidades de pH (se usó acetato para tamponar las condiciones de pH 5,00 a 5,5, se usó MES para tamponar las condiciones de pH 6,00 a 6,5 y se usó MOPS para tamponar las condiciones de 7,00 a 7,5). Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente. Se usó como carga para estos experimentos una agrupación de Proteína A parcialmente purificada, concentrada a 5 g/l o 97 mg/ml, y el tampón intercambiado en NaOAc 15 mM. La resina fue expuesta a 5 g/l para los experimentos para determinar los valores de producto K_p . Sin embargo, para la capacidad de unión del producto real, la resina fue expuesta a 97 g/l. La solución de filtrado se capturó en una placa de recogida y después se analizó usando el lector de placas Infinite M200. La proteína unida se separó posteriormente de la resina usando dos etapas de un tampón de NaCl 2 M para aproximarse al equilibrio de masa.

Estudios de aclaramiento de virus

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de eliminación de virus de la Capto Adhere para los virus modelo 2 (MMV y X-MuLV). Las columnas, de 0,66 cm de diámetro, se empaquetaron con resinas originales hasta una altura de lecho de 20 cm. Se hizo pasar la alimentación de MAb con un 1 % de virus y luego se procesó sobre la resina Capto Adhere. Las agrupaciones se recogieron de forma inmediata y las muestras de carga y de elución se ensayaron para determinar los conteos virales. Se hicieron múltiples diluciones de las agrupaciones con Medio Completo (1:10 y 1: 100) para determinar cualquier interferencia potencial entre los componentes del tampón y los virus.

Ejemplo 1. Cribado de alto rendimiento

Este ejemplo describe procedimientos de cribado de alto rendimiento para determinar las capacidades de unión del material de cromatografía. Se realizó un cribado de alto rendimiento en la resina Capto Adhere en condiciones de unión por lotes para el anticuerpo monoclonal MAb3.

35 Los resultados del cribado de alto rendimiento de las condiciones de unión se presentan en la figura 1. En las figuras de superficie de respuesta (figuras 1A y 1B), las regiones de unión al producto se indican en rojo (región 8 de la figura 1A y región 7 en la figura 1B) y el producto, por ejemplo polipéptido, las regiones no unidas son verdes (indicadas como región 1). Los contenidos reales de proteína de la célula huésped (HCP) (ng/mg) en el sobrenadante se muestran en la gráfica de contorno de la figura 1C. K_p del producto como una función del pH y la concentración de contraíón para MAb3 se muestra en la fFigura 1A. La resina se cargó a 5 g/l y los datos brutos se analizaron usando un modelo de superficie de respuesta. El modelo se utilizó entonces para estimar el K_p para cualquier combinación de pH y la concentración de contraíón en el espacio experimental. Los datos muestran que a medida que el pH aumenta y cuando la conductividad aumenta, el log K_p aumenta. Los incrementos en log K_p reflejan aumentos en el producto que se une a la resina. Con el fin de descubrir la capacidad real de unión del producto a la resina, la resina se expuso a 80 g/l en 48 condiciones diferentes combinando diferentes pH y concentraciones de contraíón (figura 1B). El sobrenadante de la misma placa experimental se analizó también para HCP (ng/mg) y los datos se representaron en forma de contorno (figura 1C). Se usó agrupación de Proteína A parcialmente purificada que contiene varios miles de ppm de CHOP como una carga para los experimentos de cribado de alto rendimiento. Las regiones verdes (región 1) de la figura indican la menor cantidad de CHOP en el sobrenadante y las regiones rojas (región 8 de la figura 1B y región 9 de la figura 1C) indican una mayor cantidad de CHOP en el sobrenadante.

El espacio de diseño para las condiciones óptimas de carga y elución puede determinarse a partir de las gráficas de contorno de datos de CHOP y de unión. Estas agrupaciones permiten el diseño de un modo de funcionamiento de flujo o un modo de funcionamiento de unión y elución. Las condiciones de carga para una cromatografía de flujo completo son generalmente condiciones en las que se minimiza la unión del producto, por ejemplo, polipéptido, y se maximiza la unión de impurezas (CHOP). Las regiones verdes de solapamiento completas (región 1) entre las figuras 1B y 1C sugieren que es posible un modo F/T. Sin embargo, la región verde (región 1) en este diagrama es una región donde la conductividad es realmente baja \sim 1mS. Tales condiciones requieren aproximadamente 4 veces la dilución de la agrupación de Proteína A dando como resultado desafíos de ajuste potenciales a la escala de la planta.

Las regiones rojas (región 7 en la figura 1B y región 8 en la figura 1C) indican regiones de unión para MAb y CHOP. Hay algunas regiones rojas de solapamiento en ambos diagramas. Sin embargo, la figura 1 muestra que, dentro de las concentraciones de pH y contraíón operables, era posible una capacidad de unión máxima de 55 g/l. Para un procedimiento de título elevado con un título de cultivo celular de \sim 3,5 g/l, se necesitaría una columna de 1000 l para

recuperar todo el producto, tal como un polipéptido, en un ciclo o ciclos múltiples que se realizarían en una columna más pequeña .

5 En un modo OEC, se puede elegir una condición de carga basada en el comportamiento de impurezas (por ejemplo, CHOP) en la columna. La cantidad de MAb que se une a la columna es menos preocupante porque el MAb unido puede ser recuperado por la fase de elución. Por lo tanto, existe un espacio experimental completo para diseñar la condición de carga de modo que se obtenga el máxima aclaramiento de impurezas sin estar limitada por la capacidad de unión de producto de la resina. Mientras que el modo de unión y elución permite una densidad de carga de 55 g/l, OEC permite una capacidad de carga aproximadamente 10 veces superior permitiendo de este modo la implementación de una columna más pequeña que a su vez puede reducir el coste de resina por gramo de producto y ofrece un buen ajuste de planta.

Ejemplo 2. Modo OEC optimizado

15 Los datos HTS se usaron para la determinación de parámetros para operar en un modo OEC. Basándose en los requisitos de densidad de carga, ajuste de la planta y aclaramiento de impurezas, se seleccionaron las condiciones de carga para el MAb 3 que son pH 6,5 y 5,5 mS/cm. La densidad de carga para la prueba de cromatográfica optimizada mostrada en la Figura 2 fue de 180 g/l. Aproximadamente 50 g/l de producto polipeptídico se une a la resina durante la fase de carga. La agrupación de producto se recogió comenzando a aproximadamente 0,5 DO, y el producto se sobrecargó en la resina hasta 180 g/l. Después de completarse la fase de carga, se usó la fase de elución con tampón de baja conductividad de 1 mS/cm (tampón de elución: MES 20 mM, pH 6,5) para eluir la proteína unida, resultando en una reducción del volumen de la agrupación del 10-15 % en comparación con la cromatografía de flujo. El rendimiento y el aclaramiento de impurezas para esta prueba de cromatografía se muestran en la figura 3.

Ejemplo 3. Optimización de carga

Este estudio se llevó a cabo para comparar los datos de HTS y los datos reales de rendimiento de la columna en el modo de funcionamiento de OEC. Las columnas se cargaron a tres pH diferentes. Se seleccionó pH 6,5 para ser la mejor condición basándose en el aclaramiento inicial de CHOP y en los datos de rendimiento. Las concentraciones de CHOP en las agrupaciones oscilaron entre 900 y 50 a 400 ppm en función del pH de la carga. A partir de este estudio, se determinó que el pH 6,5 era la mejor condición para cargar la composición. Además, aunque el rendimiento no se optimizó, el pH 6,5 proporcionó también el rendimiento máximo (figura 3, tabla 3).

Tabla 3. Optimización de la condición de carga para un modo OEC

Carga		Elución		CHOP en la agrupación (ppm)	Unión de MAb (g/l)	Rendimiento (%)
pH	Conductividad (mS/cm)	pH	Conductividad (mS/cm)			
8	5,4	8	2,7	895	63	60
6,5	5,6	6,5	2,1	48	49	92
5,5	5,3	5,5	3,3	359	29	86
Carga CHOP: 20000 ppm						
Densidad de carga: 150 g/l						

Ejemplo 4. Optimización de la elución

40 Este estudio se llevó a cabo para optimizar las condiciones de elución para OEC. Con el fin de recuperar el producto (MAb 3, ~ 50 g/l) que se unió durante la fase de carga, se pasaron unos cuantos volúmenes de columna de tampón de lavado (MES 50 mM, acetato de Na 30 mM, pH 6,5, ~ 5,5 mS/cm) a través de la columna después de la finalización de la fase de carga. Se observó una gran cantidad de colas resultando en un aumento en el volumen del agrupamiento al final de la fase de carga. El aumento en el volumen del agrupamiento fue de aproximadamente un 45 % usando un tampón de lavado con un pH y conductividad similares al tampón de carga. Este aumento en el volumen de la agrupación puede resultar en problemas de ajuste de la planta (figura 4).

El objetivo del estudio de optimización de la elución fue obtener el máximo rendimiento con un mínimo de CHOP y una reducción máxima del volumen de la agrupación. La fase de elución se desarrolló para eluir los 50 g/l de producto unido de la columna. La figura 5 muestra la fase de elución de los cromatogramas. Un tampón de conductividad inferior eluye el producto de la columna dentro de los volúmenes de 2 columnas dando como resultado un rendimiento más alto y un volumen de piscina menor (tabla 4). Por otro lado, los tampones de elución de mayor conductividad dieron como resultado colas de más de 8 volúmenes de columna. Como se muestra en la Tabla 4, CHOP de la agrupacion fue menor de 20 ppm en todos los tampones de elución probados. Por lo tanto, se seleccionó MES 20 mM como tampón de elución para aumentar el rendimiento y para minimizar la cola.

Tabla 4. Optimización de la elución para OEC

Tampón de elución	CHOP (ppm)	% Rendimiento
MES 100 mM, pH 6,5, 4 mS	13	91
MES 100 mM, pH 6,5, 2 mS	11	93
MES 100 mM, pH 6,5, 1 mS	17	94
Agua	15	90
Carga CHOP: 3200 ppm		
Condiciones de carga: pH 6,5, 5,5 mS/cm		
Densidad de carga: 100 mg/l		

Ejemplo 5. Análisis de impurezas en OEC

5 Las fracciones de OEC se analizaron en busca de impurezas. La Figura 6A muestra las concentraciones de MAb y los niveles de CHOP en las fracciones recogidas durante la fase de carga y durante la fase de elución. Durante la fase de carga, CHOP permaneció entre 20-25 ppm y durante la fase de elución donde sólo se eluye el MAb unido, el nivel de CHOP fraccionario disminuye. El análisis acumulativo demuestra que el CHOP y otras impurezas permanecen bastante consistentes a través de toda la carga y de las fases de elución (figura 6B). La densidad de carga para este ensayo fue de 180 g/l. El aclaramiento de virus, utilizando X-MuLV y MMV como virus modelo, también se estudió para la misma densidad de carga (tabla 5). Para este experimento, el pH de carga fue 6,5 y la conductividad de carga fue de 5,5 mS/cm. Las condiciones de elución fueron MES 20 mM pH 6,5 y conductividad de ~ 1 mS/cm.

Tabla 5. Aclaramiento del virus para la cromatografía en modo OEC.

Densidad de carga para la resina Capto Adhere	X-MuLV LRV	MMV LRV
180 g/l	3,6	3,3

Ejemplo 6. Determinación de la capacidad de unión de impurezas máxima

20 Para hallar la máxima capacidad de unión de impurezas a la resina cargada con MAb3 por el modo OEC, la resina Capto Adhere fue expuesta a 1000 g/l con la agrupación de Proteína A. El tampón de carga fue de pH 6,5, ~ 5,5 mS/cm; el tampón de elución fue MES 20 mM, pH 6,5, ~1 mS/cm. La muestra de agrupación se recogió cada 50 g/l y se analizó para CHOP y la concentración de proteínas (figura 7). Para densidades de carga de hasta 800 g/l, CHOP no se rompió y el CHOP en el eluato fue inferior a 20 ng/mg.

Ejemplo 7. Implementación a escala piloto

30 El modo de funcionamiento de OEC se implementó en columnas de escala piloto que varían en tamaño de 1,6 l a 10,8 l. Los diámetros de las columnas oscilaban entre 10 cm a 25 cm con alturas de lecho que varían de 20 – 22 cm (Tabla 6). Las muestras se cargaron a pH 6,5, ~ 5,5 mS/cm y se eluyeron con MES 20 mM a pH 6,5, ~ 1 mS/cm. El rendimiento a través de la escala piloto se muestra en la Figura 8. Las densidades de carga en las pruebas a escala piloto cubrían una gama de densidades de carga de 70 a 180 g/l. Con todas las densidades de carga se alcanzó un rendimiento medio de un 94 %. No hubo impacto en el rendimiento sobre el intervalo de densidades de carga ensayadas. Con todos los ensayos de escala piloto, la agrupación de CHOP de modo OEC era inferior a 25 ppm, que se eliminó después a <2 ppm de CHOP en el producto polipéptido final (agrupación de UDFD) (tabla 7). En promedio, hubo una reducción de un 1,1 % en las proteínas HMW en todas las pruebas a escala piloto (tabla 8) y una reducción del 0,19 % en las proteínas LMW en todas las pruebas a escala piloto (tabla 9).

Tabla 6. Tamaño de columna Capto Adhere para las pruebas a escala piloto

Prueba a Escala Piloto	BH	Diámetro (cm)	VC (l)
Prueba 1	21	10	1,6
Prueba 2	21	10	1,6
Prueba 3	20	14	3,1
Prueba 4	19	14	2,9
Prueba 5	19	14	2,9
Prueba 6	22	25	10,8
Prueba 7	22	25	10,8
Prueba 8	21,5	10	1,7

Prueba 9	20	14	3,1
Prueba 10	22	25	10,8

Tabla 7. Datos de CHOP para escala piloto

Etapas	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5	Prueba 6	Prueba 7	Prueba 8	Prueba 9	Prueba 10	Prueba 11	Prueba 12
HCCF	467000	446000	242000	343000	223000	310000	424000	355000	218000	329000	29700	21500
Proteína A Agrupación	11360	2200*	5712	9100	5100	4800	5400	6200	9000	7300	5300	4800
Capto Resina Adhere (OEC)	13	14	21	11	22	17	17	13	15	25	17	9

* CHOP después de la filtración en profundidad a pH 6,5

5 HCCF es el fluido de cultivo celular recolectado

Tabla 8. % promedio de reducción de proteínas HMW con 12 pruebas a escala piloto.

% promedio de reducción de la proteína HMW	0,95 ± 0,49
--	-------------

Tabla 9. % promedio de reducción de proteínas LMW con 12 pruebas a escala piloto.

% promedio de reducción de la proteína LMW	0,19 ± 0,08
--	-------------

10

El ADN de CHO y la Proteína A lixiviada eran menos que detectables en la agrupación después de OEC.

Ejemplo 8. Implementación a escala de producción

15

El modo de funcionamiento de OEC se implementó en una columna de escala de producción con un tamaño de 157 l (100 cm de diámetro × 20 cm de altura). A escala de producción, la columna se cargó a ~ 96 g/l. % de rendimiento con las dos pruebas a escala industrial ≥ 95 % para ambas pruebas. En todas las pruebas a escala de producción, la CHOP en agrupación en el modo OEC fue inferior a 17 ppm (tabla 10), que se aclaró aguas abajo a un nivel menor que el detectable de CHOP. En promedio, hubo una reducción de un 1,1 % en HMWs, una reducción de un 0,1 % en LMWs y una reducción de 1,65 % en ácidos con las dos pruebas a escala de producción.

20

Tabla 10. Datos de CHOP (ppm) a escala de producción

Etapas	Prueba 1	Prueba 2
HCCE	30500	32500
Agrupación de proteína A	5749	6157
Resina Capto Adhere (OEC)	16	17

25

El ADN de CHO y la Proteína A lixiviada eran menos detectables en la agrupación después del modo OEC.

Ejemplo 9. Aplicabilidad de OEC a otros MAb

30

Las agrupaciones de proteína A se usaron como cargas para estas pruebas. Las condiciones de carga y elución se seleccionaron para permitir el modo OEC. Las densidades de carga, el rendimiento en %, el MAb unido a la resina (g/l), las impurezas en la carga y la agrupación se muestran en las siguientes tablas (tablas 11, 12, 13 y 14).

Tabla 11. Aplicabilidad de OEC a otros MAb: CHOP

MAb, pH en carga (conductividad < 6 mS/cm)	Densidad de carga (g/l)	PH y conductividad de la elución	Unión de MAb (g/l)	Carga de CHOP (ppm)	CHOP en la agrupación (ppm)	% Rendimiento
MAb 1, pH 8,6	200	PH 6,5, 1 mS/cm	35	2825	9	93
MAb 2, pH 8,6	200	PH 6,5, 1 mS/cm	24	5057	12	100
MAb 3, pH 6,5	200	PH 6,5, 1 mS/cm	45	3200	15	97

MAB 4, pH 6,1	200	pH 6,0, 0,65 mS/cm	59	193	4	93
MAB 5, pH 5,5	200	pH 4,9, 1,1 mS/cm	59	4560	145	92

Tabla 12. Aplicabilidad de OEC a otros MAB: % de proteínas HMW

MAB, pH en carga (conductividad < 6 mS/cm)	Densidad de carga (g/l)	pH y conductividad de la elución	Unión de MAB (g/l)	Carga % de proteínas HMW	Agrupación % de proteínas HMW
MAB 1, pH 8,6	200	pH 6,5, 1 mS/cm	35	5,4	1,6
MAB 2, pH 8,6	200	pH 6,5, 1 mS/cm	24	5,4	3,8
MAB 3, pH 6,5	200	pH 6,5, 1 mS/cm	45	3,5	1,8
MAB 4, pH 6,1	200	pH 6,0, 0,65 mS/cm	59	1,9	0,5
MAB 5, pH 5,5	200	pH 4,9, 1,1 mS/cm	59	2,4	1,7

5

Tabla 13. Aplicabilidad de OEC a otros MAB: % de Proteína A lixiviada

MAB, pH en carga (Conductividad < 6 mS/cm)	Densidad de carga (g/l)	pH y conductividad de la elución	Unión de MAB (g/l)	Carga de Proteína A lixiviada (ppm)	Proteína A agrupación (ppm)	A en
MAB 1, pH 8,6	200	pH 6,5, 1 mS/cm	35	2	LTD*	
MAB 2, pH 8,6	200	pH 6,5, 1 mS/cm	24	2	LTD	
MAB 3, pH 6,5	200	pH 6,5, 1 mS/cm	45	3	LTD	
MAB 4, pH 6,1	200	pH 6,0, 0,65 mS/cm	59	2	LTD	
MAB 5, pH 5,5	200	pH 4,9, 1,1 mS/cm	59	6	LTD	

*Menos que detectable

Tabla 14. Aplicabilidad de OEC a otros MAB: ADN de CHO

MAB, pH en carga (conductividad < 6 mS/cm)	Densidad de carga (g/l)	pH y conductividad de la elución	Unión de MAB (g/l)	Carga ADN de CHO (pg/ ml)	Agrupación ADN de CHO (pg/ ml)
MAB 1, pH 8,6	200	pH 6,5, 1 mS/cm	35	253	LTD
MAB 2, pH 8,6	200	pH 6,5, 1 mS/cm	24	297	LTD
MAB 3, pH 6,5	200	pH 6,5, 1 mS/cm	45	106	LTD
MAB 4, pH 6,1	200	pH 6,0, 0,65 mS/cm	59	17	LTD
MAB 5, pH 5,5	200	pH 4,9, 1,1 mS/cm	59	4	LTD

10

Ejemplo 10. Modos de funcionamiento de cromatografía AEX basadas en valores de K_p

En cromatografía de flujo completo (F/T), K_p es $<0,1$ y no hay unión de proteína a la resina. En la cromatografía de reparto débil (WPC), K_p es de 0,1 a 20 y hay una reparto débil entre el producto y los medios de cromatografía. En un modo de unión y eluido, el producto se une estrechamente a la resina y el K_p es >100 pero la densidad de carga se limita a la capacidad de unión del producto. Sin embargo, en un modo de sobrecarga y elución de cromatografía (MAB3), se encontraron condiciones de carga tales que K_p del producto y las impurezas eran > 100 y aunque el producto fluye después de alcanzar su capacidad de unión, las impurezas mantienen la unión a la resina y no se rompe hasta que alcancen su capacidad de unión, que podría ser superior a la capacidad de unión del producto.

Se encontraron condiciones de elución tales que el producto polipeptídico $K_p <2$. El producto unido se recupera pero la mayoría de las impurezas permanecen unidas (K_p de impureza > 100). Como tal, este modo permite una buena eliminación de impurezas al tiempo que proporciona un rendimiento muy alto (por ejemplo, 3, tabla 15).

25

Tabla 15. MAB 3 como un modelo de anticuerpo en la resina Capto Adhere

Parámetros	WPC	OEC
Carga	Agrupación de Proteína A (MAB 3)	
Condiciones de carga	pH 5, 4,4 mS/cm	pH 6,5, 5,5 mS/cm
K_p	2,6	>100
Log K_p	0,4	4,15
Carga de CHOP	20000 ppm	
Producto de unión (resina g/l)	20	50

CHOP en la agrupación (ppm)	360	50
% Rendimiento	86	95

5 Los cromatogramas de pruebas en columna en condiciones de reparto débiles ($K_p = 2,4$) y condiciones de sobrecarga y elución ($K_p > 100$) muestran los efectos del aumento del K_p mAb en las regiones de ruptura del producto del cromatograma (figura 9). Condiciones de carga de WPC: pH 5,5, 4,4 mS/cm; condiciones de lavado de WPC: Acetato 20 mM pH 5, 4,4 mS/cm. Condiciones de carga en OEC: pH 6,5, 5,5 mS/cm; condiciones de elución en OEC: MES 20 mM pH 6,5, ~1 mS/cm.

10 Tabla 16. AEX eAnálisis de una etapa de refinado de AEX para un MAb que se une a la resina AEX a un flujo típico con las condiciones del proceso

Modo de funcionamiento	F/T	B/E	OEC
Densidad de carga (g/l _{resina})	-200	50	800
Tamaño de la columna *	220 l	850 l	52 l
Volumen de la agrupación	11 000 l	Elución (3400 l) ~4VC	-2500 l
Ajuste de la planta (limitación del tanque de la agrupación)	Volumen de la agrupación muy grande debido a una dilución de carga de ~ 5X	Columna grande o ciclos múltiples	Mejor ajuste de planta Reduce el volumen de la agrupación por ~ 10 – 40 %
Coste de la resina**	\$ 0,7 millones	\$ 2,98 millones	\$ 0,18 millones

Modelo de anticuerpo: MAb 3

* Se supone una cosecha de 12.500 l a un título de 3,5 g/l.

** Resina CA a \$ 3500/l

15 Ejemplo 11. Aplicabilidad OEC para diferentes resinas

20 Dependiendo del pl de la molécula, puede aplicarse OEC a las siguientes resinas multi-modo (Capto Adhere, QMA, MEP Hypercel, HEA Hypercel, PPA Hypercel, Capto MMC). La unión del producto polipeptídico a la resina Capto Adhere era más hidrófoba por naturaleza y el producto unido se podía eluir de la columna disminuyendo la conductividad del tampón de elución (figura 5). Sin embargo, el modo de unión del producto a la resina y la elución del producto a partir de la resina no se limita a las interacciones hidrófobas y por lo tanto el modo de funcionamiento de la OEC puede ser ampliamente usado también en otros materiales de cromatografía. La tabla 17 demuestra que OEC se puede aplicar a otras resinas CEX y resinas IEX. Los tampones de elución eran MES 20 mM a menos que se indicara de otro modo. El potencial de OEC no se limita a las resinas anteriores y actualmente se está evaluando. El análisis de avance del MAb 3 en la resina QMA se muestra en la figura 10. El análisis de avance del MAb 4 en la resina Capto Adhere se muestra en la figura 11. El análisis de avance del MAb 4 en la resina Capto MMC se muestra en la figura 12. El análisis de avance del MAb 3 en la resina Capto Adhere se muestra en la figura 13.

30 Tabla 17. Aplicabilidad de OEC a diferentes resinas.

mAb	Resina:	Carga		Elución		Densidad de carga (g/l)	Unión a MAb (g/l)	Carga CHOP (ppm)	CHOP en la agrupación (ppm)	% Rendimiento
		pH	Condo (mS/cm)	pH	Condo (mS/cm)					
MAb 3	Capto Adhere	6,5	<5,5	6,5	1	200	50	3200	15	97
	QMA	6,5	<5,5	6,5	1	103	17	1800	99	93
MAb 3 *	Poros XS	5,5	<6	5,5	**	200	100	9900	370	92
MAb 4	Capto Adhere	6,1	<5,5	6,0	0,65	200	59	193	4	93
	Capto MMC	7	<6	6,5	1	147	10	187	27	93

** Condiciones de carga para Poros XS MAb 3: pH 5,5, <6 mS/cm; condiciones de elución: Tampón A – Acetato 50 mM pH 5,5, ~ 3 mS/cm, tampón B - acetato 350 mM pH 5,5, -24 mS/cm, gradiente: 20-85 % más de 10 VC, agrupación: 1-8, 2000).

35

Ejemplo 12. Elución con gradiente en OEC

Otro objetivo del estudio de optimización de la elución fue evaluar el efecto de las condiciones de elución con gradiente en el modo OEC sobre la resina Cpto Adhere. La fase de elución se desarrolló para eluir el producto unido (tabla 18). En una prueba de elución con gradiente, se puede variar la fuerza iónica, el pH, la composición y la concentración de la fase móvil basándose en los requerimientos. La tabla 18 muestra las condiciones de funcionamiento: las condiciones de carga (pH y conductividad) y de elución (pH y gradiente de conductividad). Todos los datos mostrados en la tabla se obtuvieron a partir de pruebas de cromatografía cargadas a una densidad de carga de 150 g/l con MAb3. Estas pruebas se realizaron como prueba de concepto para demostrar que la elución con gradiente se puede realizar en modo de cromatografía de OEC y se puede optimizar la pendiente de gradiente (concentración de la sal (mM)/volumen de columna). Se puede observar que el % de HMWS se reduce en un 38 % en promedio cuando se compara con la carga (Tabla 18). CHOP se redujo a <20 ppm en una conductividad de 5,5 mS/cm y la mayor conductividad funcionó a 10 mS/cm, resultando en agrupación de CHOP de ~ 150 ppm (tabla 19).

Tabla 18. La elución con gradiente se ejecuta en OEC: % de datos HMW

Carga pH	Carga Conductividad	Elución con gradiente Condiciones	Producto Límite (g/l)	% HMWS Carga	% HMWS Agrupación
6,5	5,5 mS/cm	5,5 mS/cm a 1 mS/cm más de 10 VC	43	4,0	2,4
6,5	5,5 mS/cm	5,5 mS/cm a 1mS/cm más de 15 VC	43	4,0	2,8
6,5	10 mS/cm	10 mS/cm a 1mS/cm más de 5 VC	48	3,8	2,4
6,5	10 mS/cm	10 mS/cm a 1mS/cm más de 10 VC	48	3,9	2,2

Tabla 19. La elución con gradiente se ejecuta en OEC: Datos CHOP:

Carga pH	Carga Conductividad	Elución de gradiente Condiciones	Carga de CHOP (ppm)	CHOP de la agrupación (ppm)
6,5	5,5 mS/cm	5,5 mS/cm a 1 mS/cm más de 10 VC	3100	17
6,5	5,5 mS/cm	5,5 mS/cm a 1mS/cm más de 15 VC	3100	19
6,5	10 mS/cm	10 mS/cm a 1mS/cm más de 5 VC	3100	160
6,5	10 mS/cm	10 mS/cm a 1mS/cm más de 10 VC	3100	143

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para purificar un polipéptido a partir de una composición que comprende el polipéptido y uno o más contaminantes, comprendiendo dicho procedimiento
- 10 a) cargar la composición en un modo mixto, un intercambio aniónico, una interacción hidrófoba, o un material de cromatografía de afinidad en 20 veces la capacidad de unión dinámica del material de cromatografía para el polipéptido usando un tampón de carga, en donde el coeficiente de reparto del material de cromatografía para el polipéptido es mayor que 30,
- 15 b) eluir el polipéptido del material de cromatografía en condiciones en las que el uno o más contaminantes permanecen unidos al material de cromatografía utilizando un tampón de elución, en el que el tampón de elución tiene una conductividad menor que la conductividad del tampón de carga y
- 20 c) agrupación de fracciones que comprenden el polipéptido en el efluente de cromatografía de las etapas a) y b).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un anticuerpo o inmunoadhesina.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o humano.
- 25 5. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un fragmento de unión al antígeno, opcionalmente en el que el fragmento de unión al antígeno es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un scFv, un di-scFv, un bi-scFv, un tándem (di, tri)-scFv, un Fv, un sdAb, un anticuerpo trifuncional, un BiTE, un diacuerpo o un triacuerpo.
- 30 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polipéptido es una enzima, una hormona, una proteína de fusión, una proteína que contiene Fc, un inmunocombinado, una citocina o una interleucina.
- 35 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el al menos un contaminante es uno o más de la proteína de ovario de hámster chino (CHOP), una proteína de célula huésped (HCP), proteína A lixiviada, carboxipeptidasa B, ácidos nucleicos, ADN, variantes del producto, proteína agregada, componente de medio de cultivo celular, gentamicina, fragmento polipeptídico, endotoxina y contaminante viral.
- 40 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la densidad de carga está entre aproximadamente 50 g/l y aproximadamente 2000 g/l.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la composición se carga sobre el material de cromatografía a aproximadamente las capacidades de unión dinámica de los materiales de cromatografía para uno o más contaminantes.
- 45 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el tampón de carga tiene una conductividad de aproximadamente 4,0 mS a aproximadamente 7,0 mS y el tampón de elución tiene una conductividad de aproximadamente 0,0 mS a aproximadamente 7,0 mS.
- 50 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la conductividad del tampón de elución disminuye en un gradiente de aproximadamente 5,5 mS a aproximadamente 1,0 mS sobre aproximadamente 10 volúmenes de columna (VC).
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el tampón de elución tiene un pH menor que el pH del tampón de carga.
- 55 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el tampón de carga tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 y el tampón de elución tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9.
- 60 14. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que el tampón de elución tiene un pH mayor que el pH del tampón de carga.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el tampón de carga tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 y el tampón de elución tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9.

16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que la composición es un eluyente de una cromatografía de afinidad, una cromatografía de intercambio catiónico, una cromatografía de intercambio aniónico, una cromatografía de modo mixto o una cromatografía de interacción hidrófoba.
- 5 17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que la cromatografía de afinidad es una cromatografía de Proteína A.

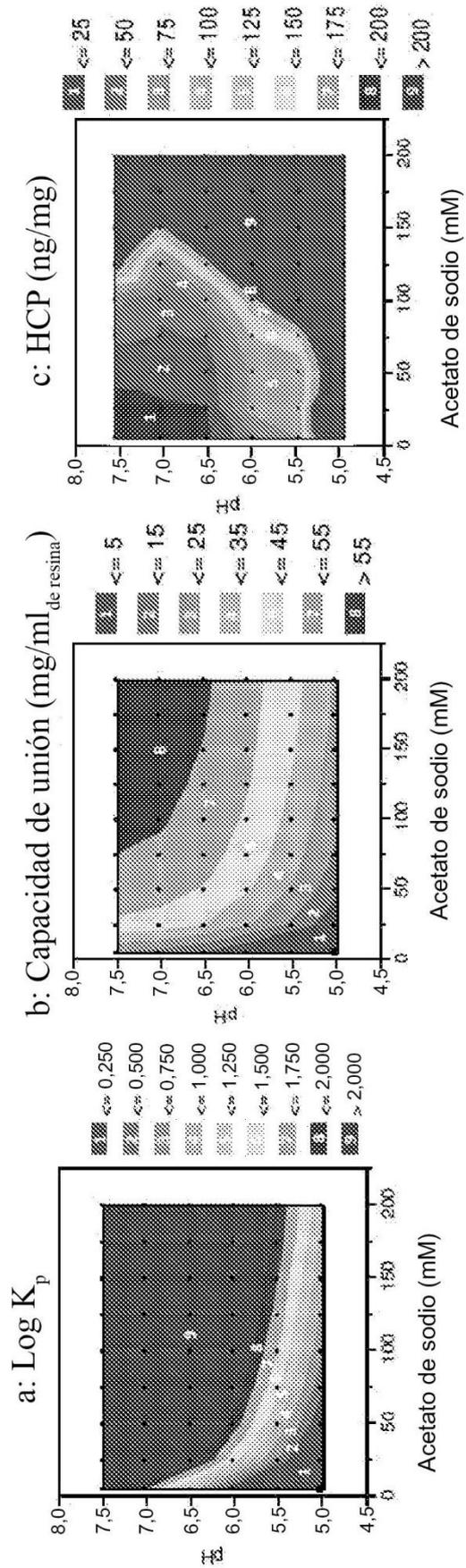


Figura 1

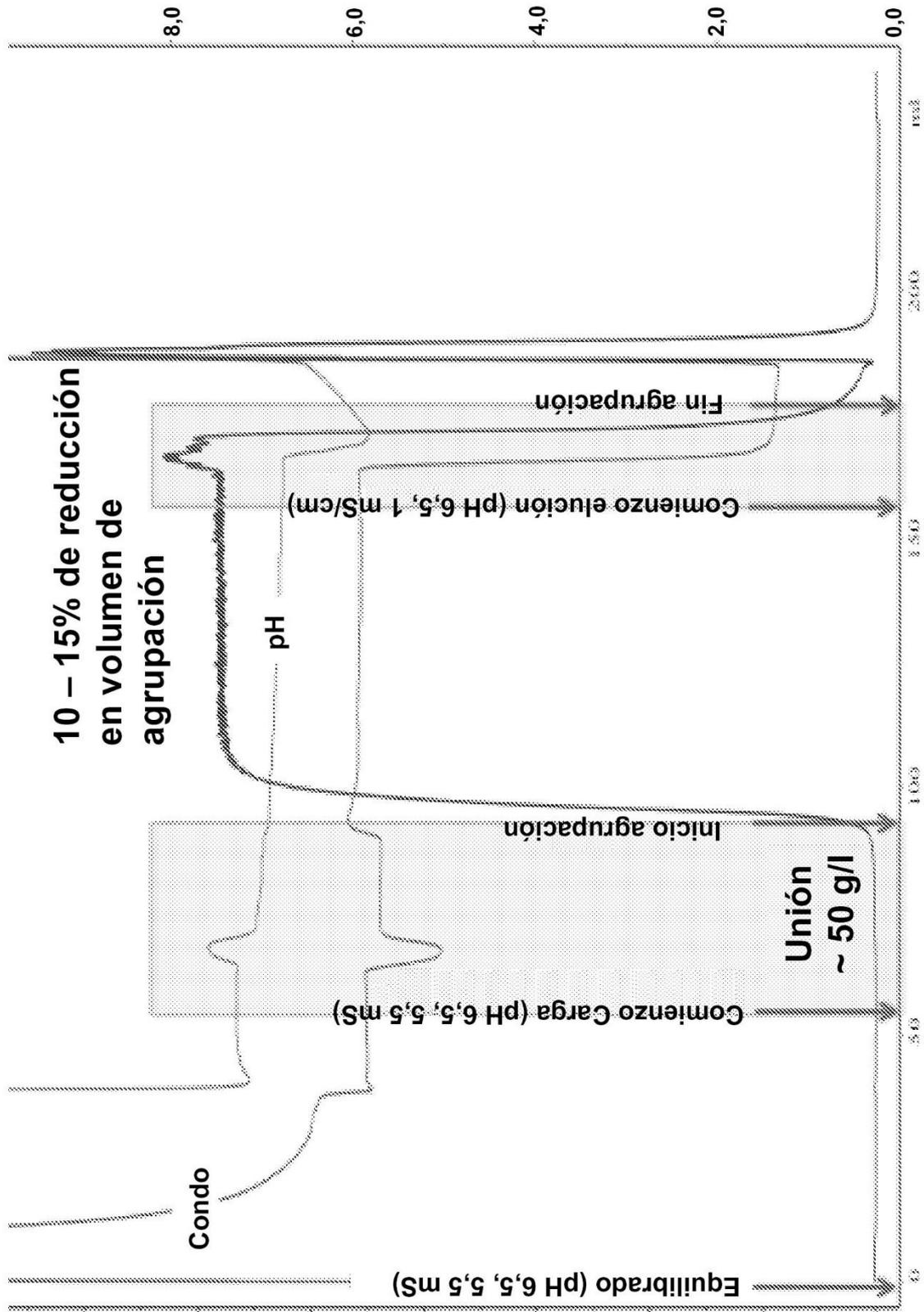


Figura 2

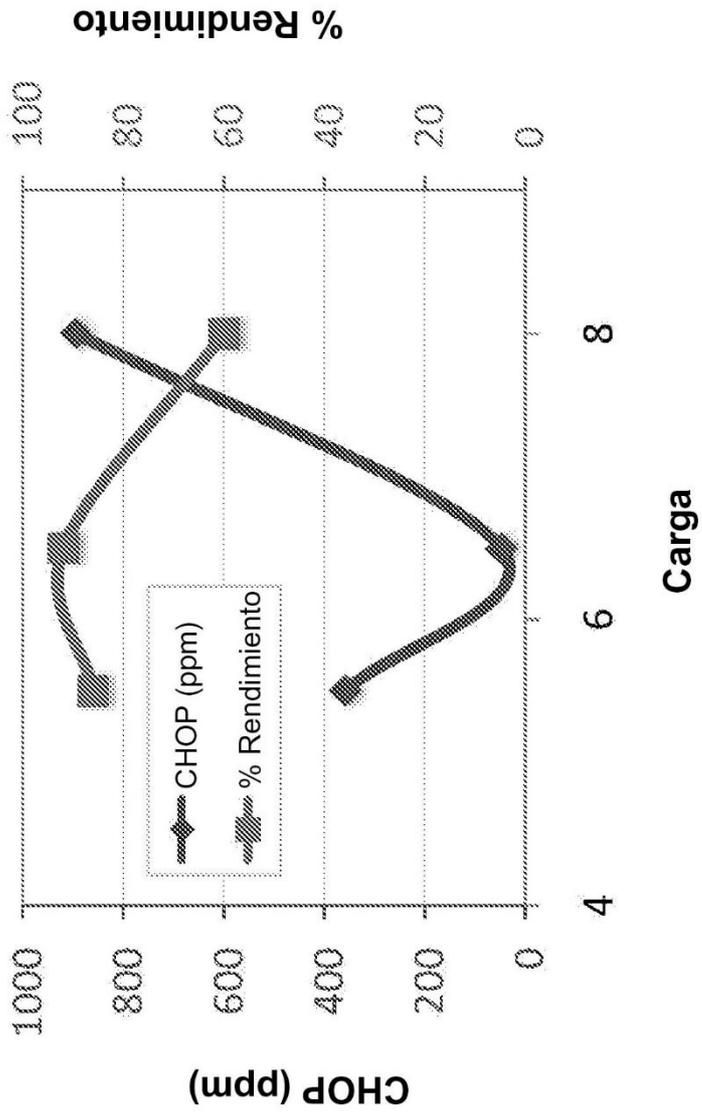


Figura 3

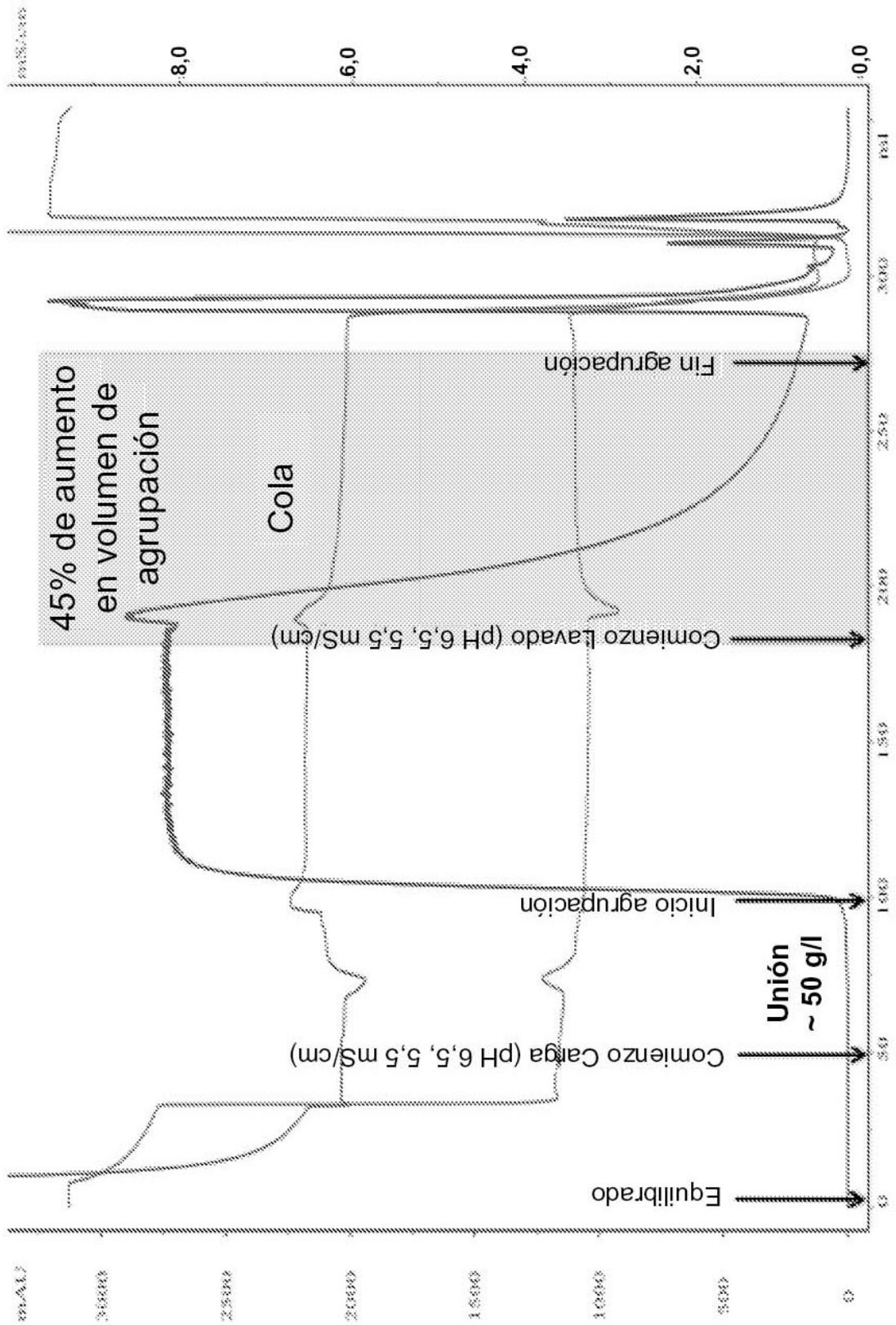


Figura 4

Figura 5

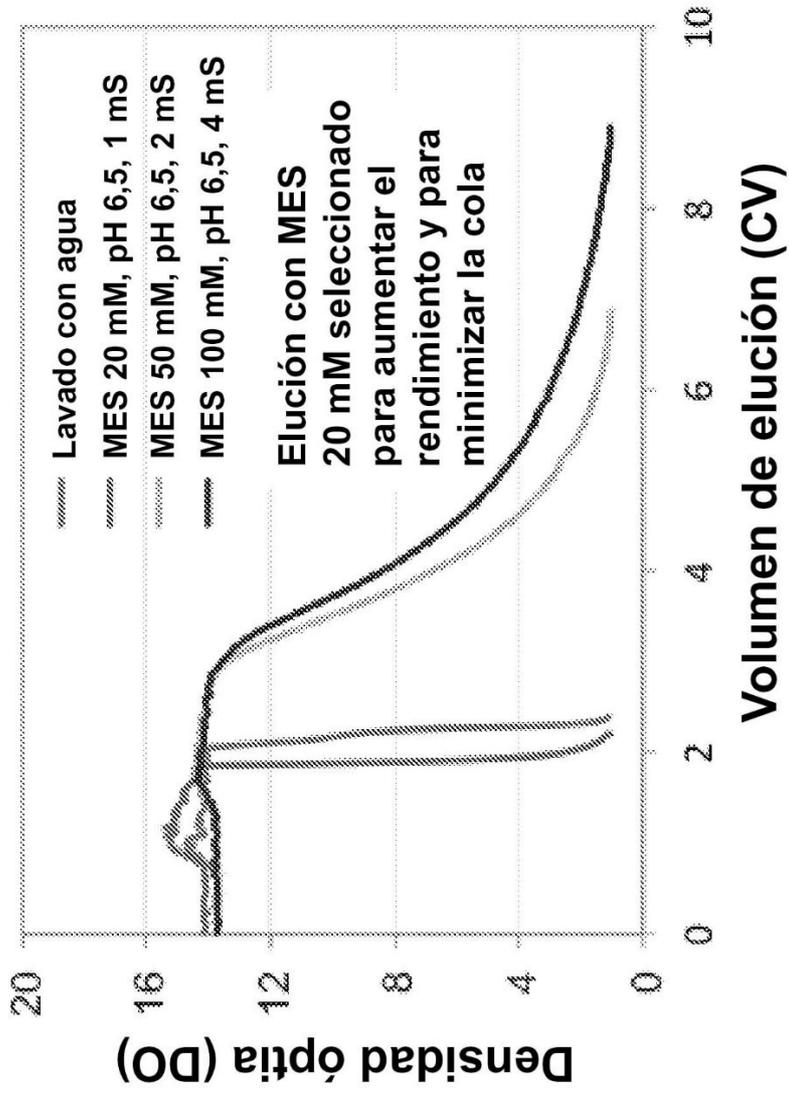
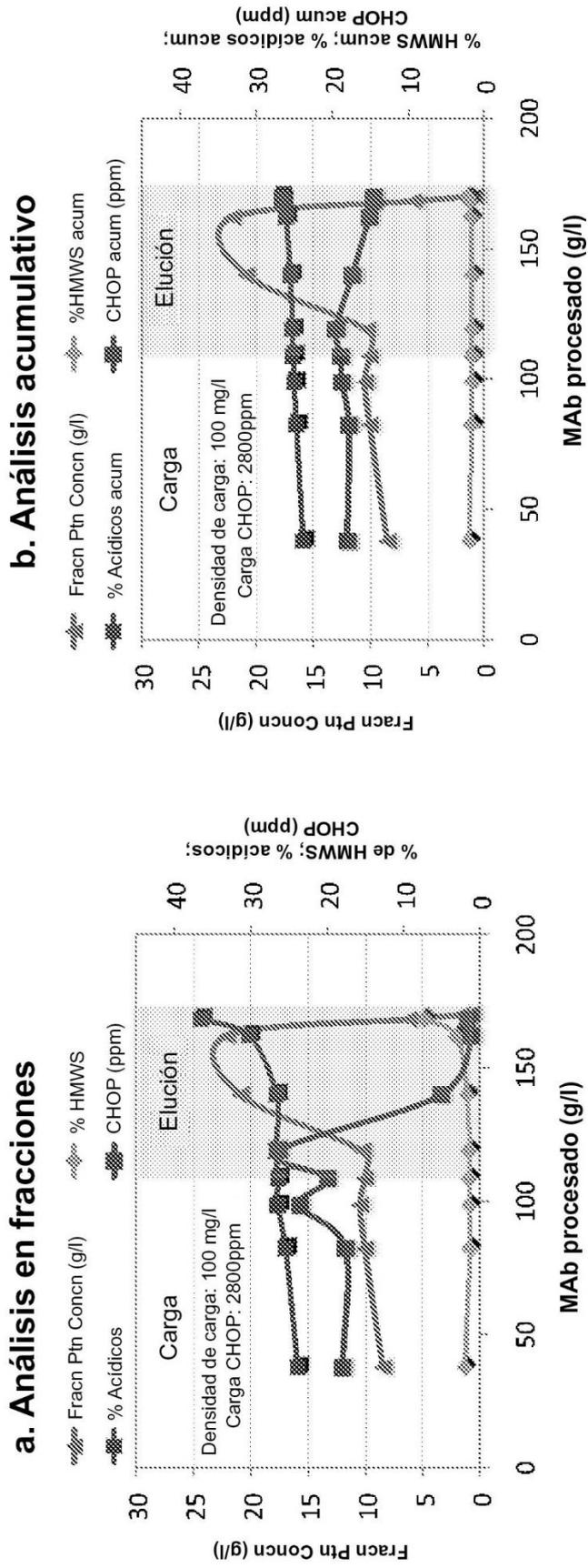


Figura 6



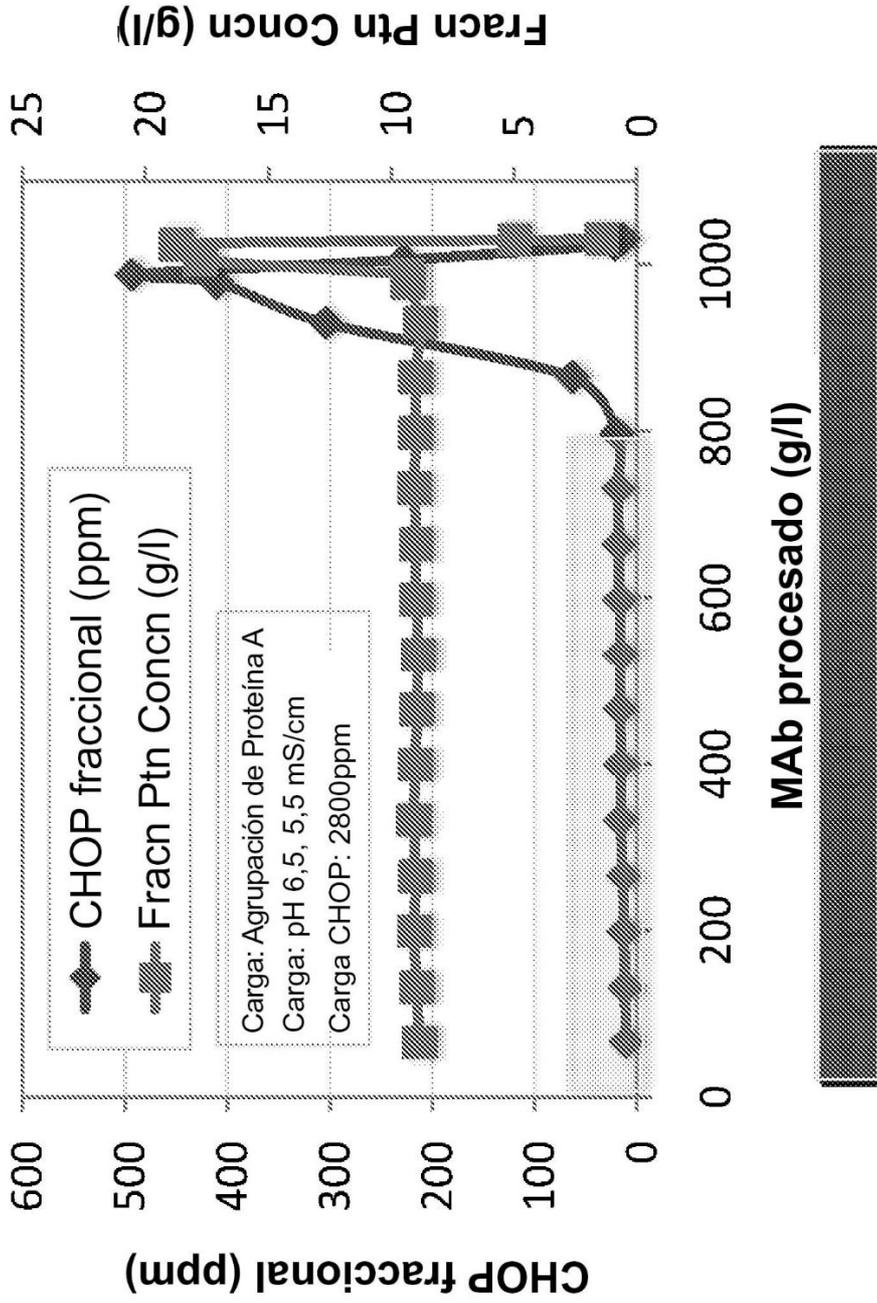


Figura 7

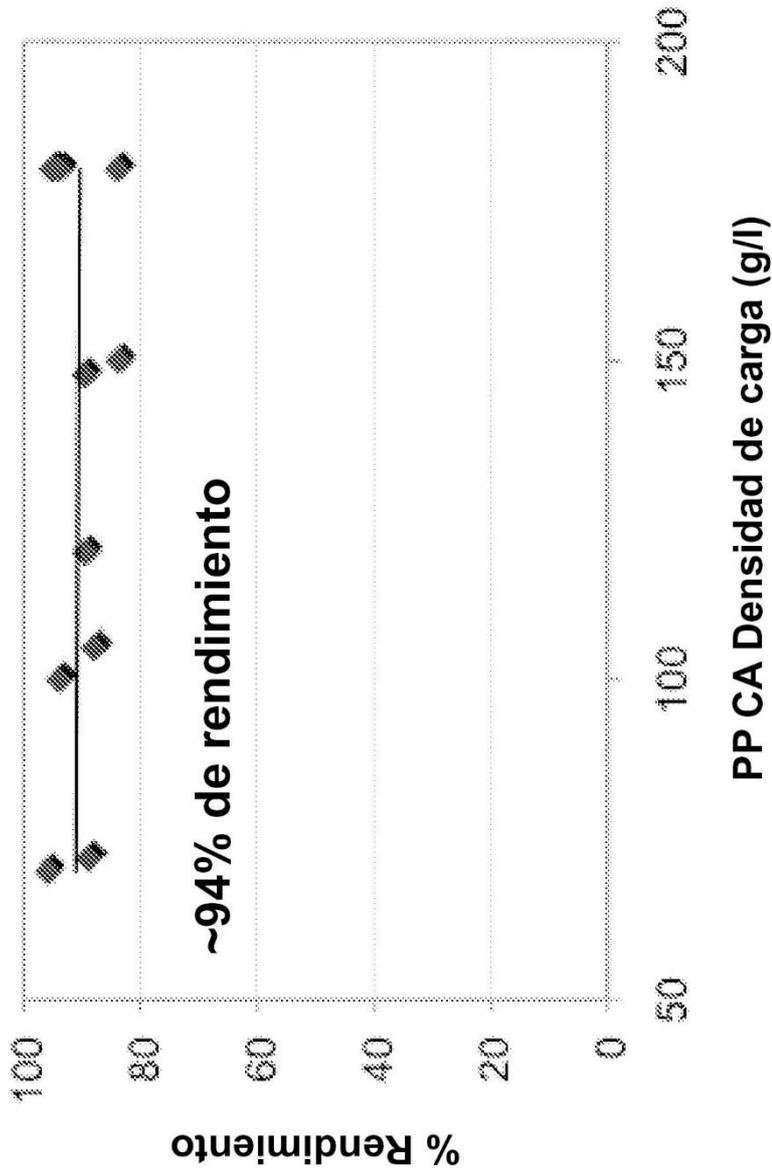


Figura 8

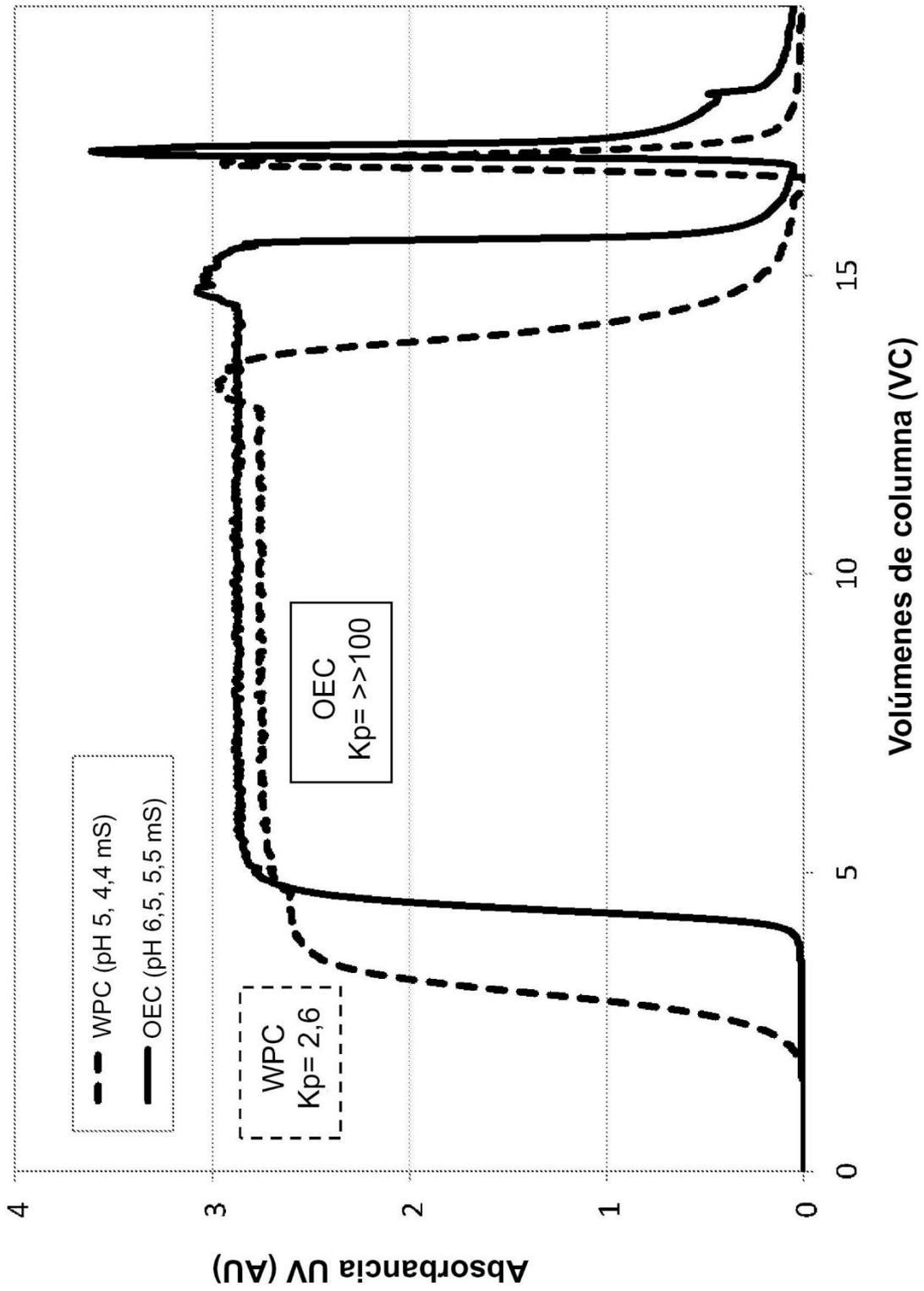


Figura 9

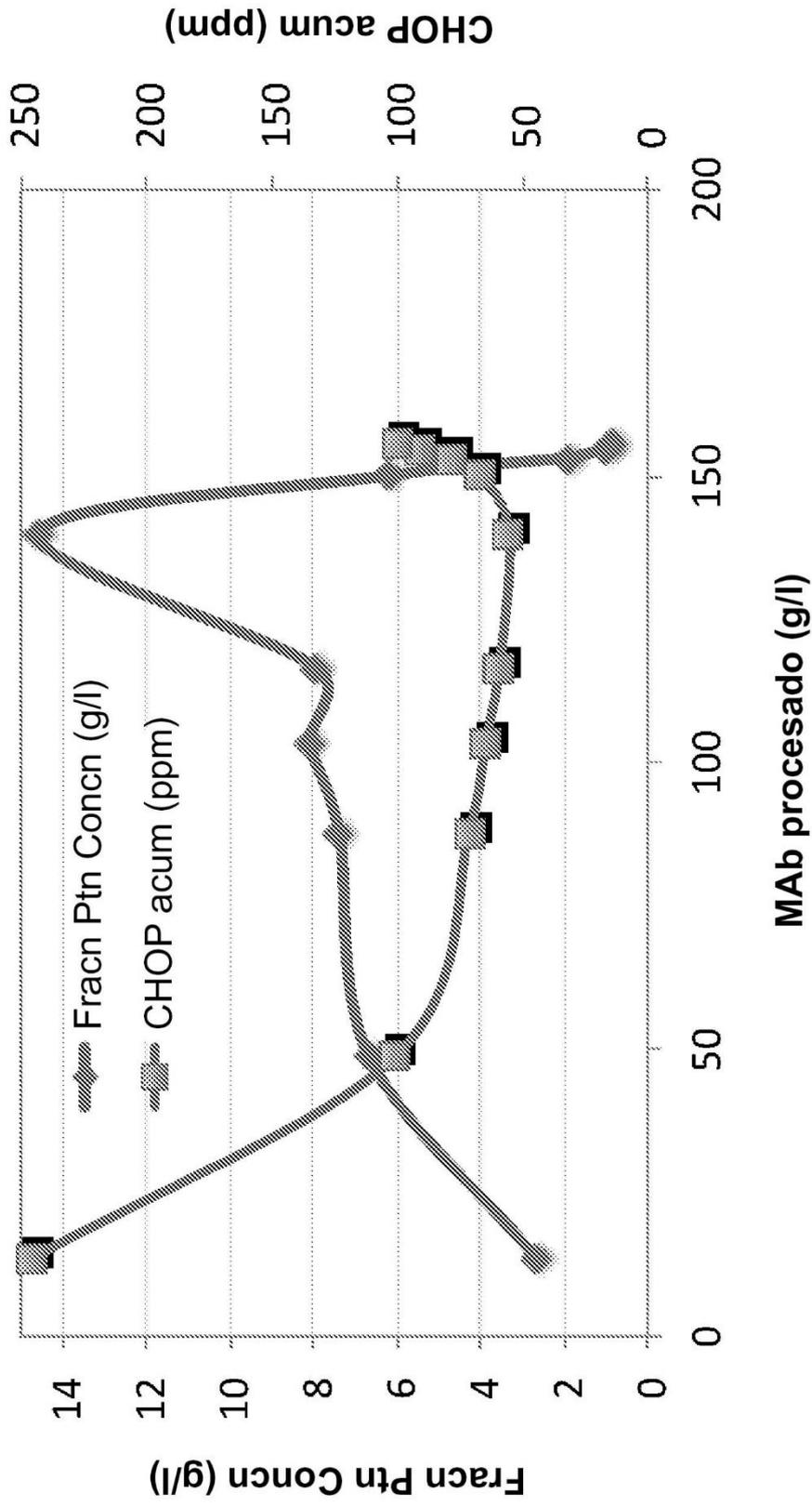


Figura 10

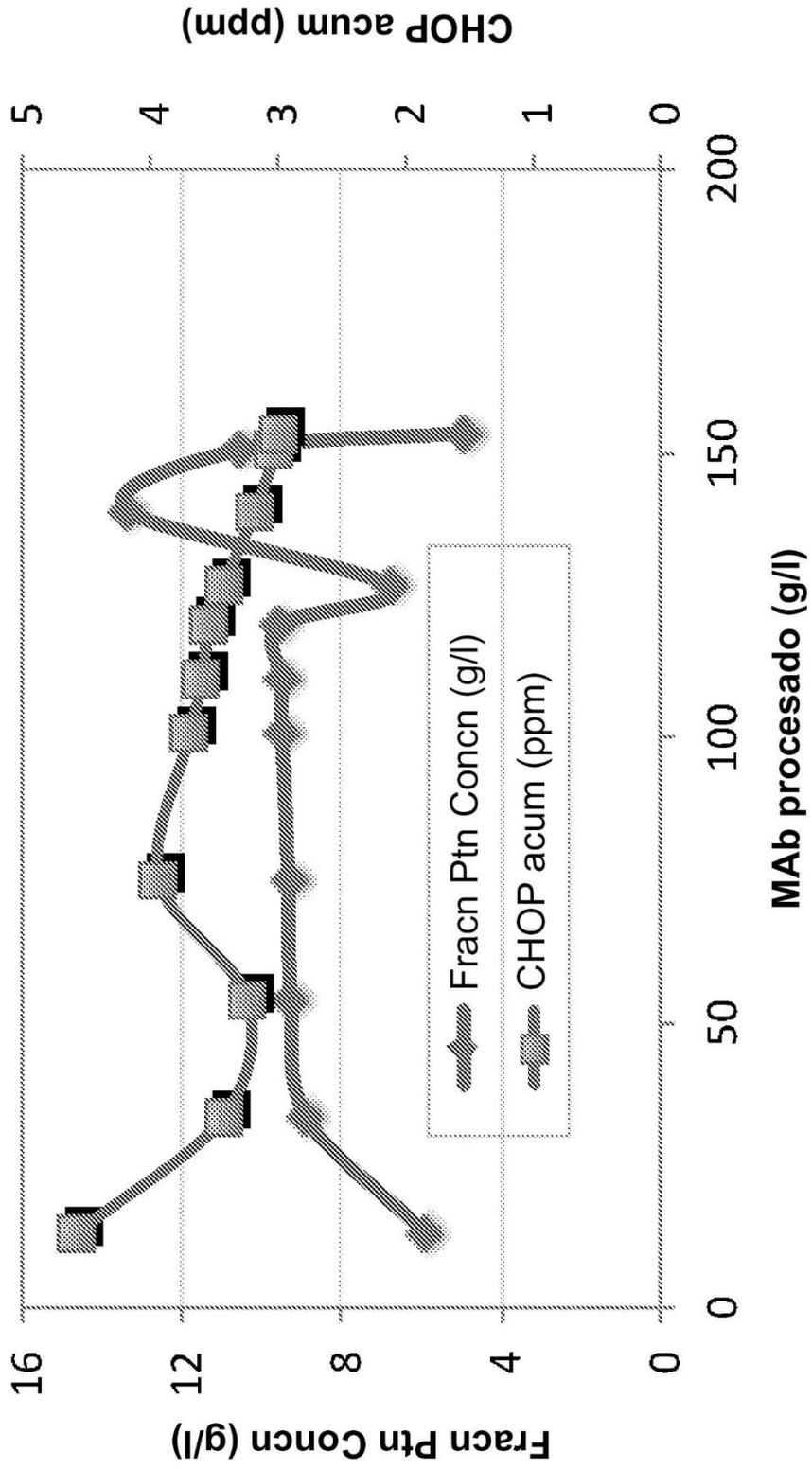


Figura II

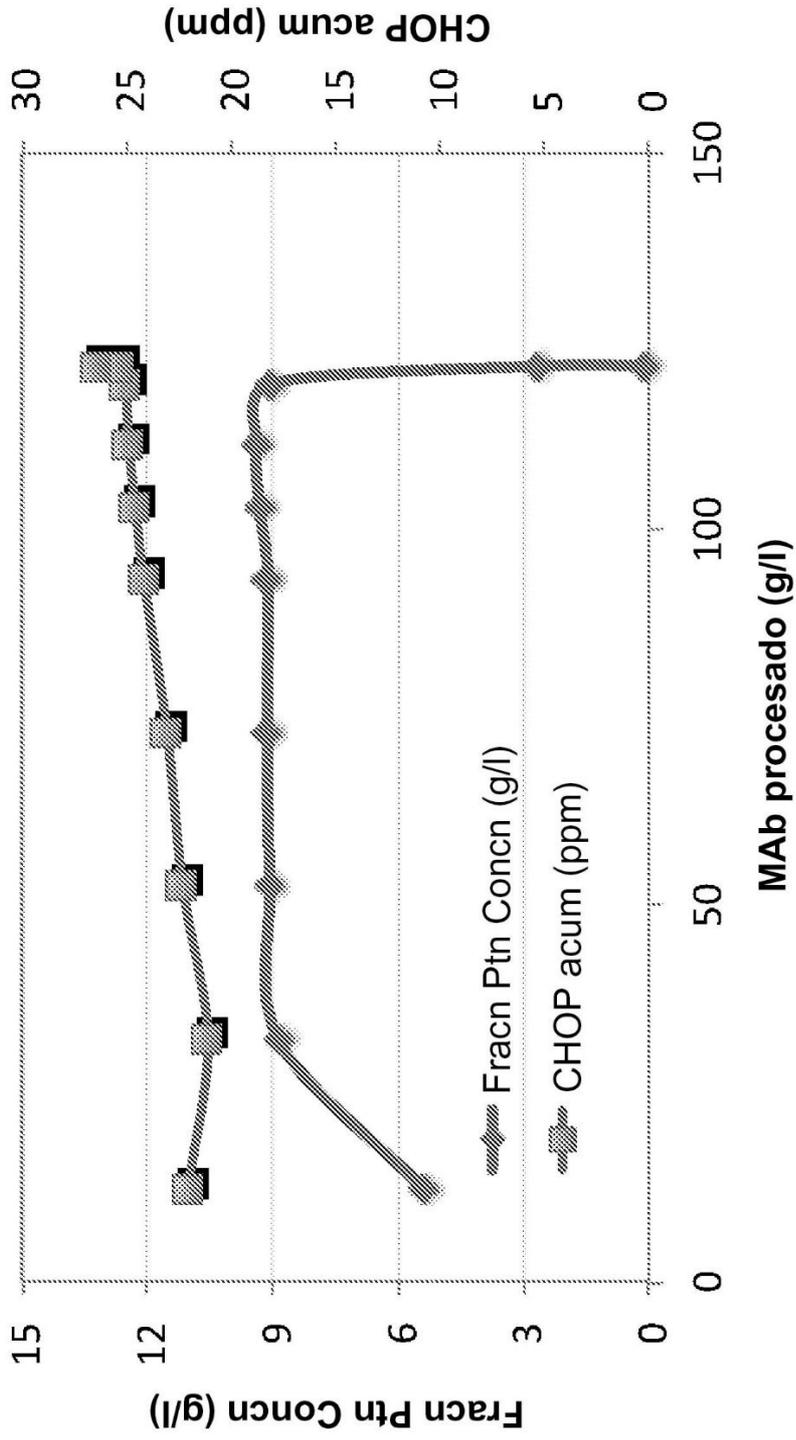


Figura 12

Figura 13

