

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 744**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/16** (2006.01)

**C07K 1/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2013 E 13275053 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2639239**

54 Título: **Eliminación de agregados de proteína de preparaciones biofarmacéuticas en un modo de flujo continuo**

30 Prioridad:

**12.03.2012 US 201261609533 P**

**29.06.2012 US 201261666578 P**

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

**30.11.2017**

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)  
Frankfurter Strasse 250  
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**KOZLOV, MIKHAIL;  
CATALDO, WILLIAM;  
POTTY, AJISH;  
GALIPEAU, KEVIN;  
HAMZIK, JAMES;  
UMANA, JOAQUIN y  
PEECK, LARS**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 644 744 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**

Eliminación de agregados de proteína de preparaciones biofarmacéuticas en un modo de flujo continuo

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para eliminar agregados de proteína de preparaciones biofarmacéuticas que contienen un producto de interés en un modo de flujo continuo.

**10 Antecedentes de la invención**

15 Los agregados de proteína son impurezas importantes que deben eliminarse de las preparaciones farmacéuticas que contienen un producto de interés, p.ej., una proteína terapéutica o una molécula de anticuerpo. Por ejemplo, es necesario eliminar los agregados de proteína y otros contaminantes de preparaciones biofarmacéuticas que contienen un producto de interés antes de poder utilizar el producto en aplicaciones de diagnóstico, terapéuticas y otras aplicaciones. Asimismo, los agregados de proteína se encuentran también en preparaciones de anticuerpos recogidos de líneas celulares del hibridoma y deben ser eliminados antes de la utilización de la preparación de anticuerpo para el fin pretendido. Esto es especialmente importante en el caso de aplicaciones terapéuticas y para obtener la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.

20 La eliminación de los agregados de proteína puede constituir todo un reto, ya que a menudo existen similitudes entre las propiedades físicas y químicas de los agregados de proteína y el producto de interés en una preparación biofarmacéutica que es por lo general una molécula monomérica. Existen muchos métodos diferentes dentro de la técnica para eliminar los agregados de proteína de las preparaciones biofarmacéuticas, entre los que se incluyen, por ejemplo, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de interacción hidrofóbica.

25 Se conocen varios métodos de cromatografía de unión y elución para separar agregados de proteínas del producto de interés. Por ejemplo, se ha utilizado hidroxipatita en la separación cromatográfica de proteínas, ácidos nucleicos, así como anticuerpos. En la cromatografía con hidroxipatita, normalmente se equilibra la columna y se aplica la muestra a una baja concentración de tampón fosfato y, a continuación, se eluyen las proteínas adsorbidas en un gradiente de concentración de tampón fosfato (véase, p.ej., Giovannini, *Biotechnology and Bioengineering* 73:522-529 (2000)). Sin embargo, en varios casos, los investigadores no han podido eluir selectivamente anticuerpos de la hidroxipatita o han observado que la cromatografía con hidroxipatita no tenía como resultado un producto lo suficientemente puro (véase, p.ej., Jungbauer, *J. Chromatografía* 476:257-268 (1989); Giovannini, *Biotechnology and Bioengineering* 73:522-529 (2000)).

30 Por otra parte, se ha utilizado con cierto éxito hidroxipatita cerámica (CHT), una resina para cromatografía disponible en el mercado para eliminar los agregados de proteína en un formato de resina (BIORAD CORP, véase también, p.ej., la publicación de patente Estadounidense no. WO/2005/044856), sin embargo, por lo general resulta cara y presenta una baja capacidad de unión para los agregados de proteína.

35 Se ha descrito también un método de cromatografía de intercambio catiónico de unión y elución que se utiliza a veces en la industria para la eliminación de agregados (véase, p.ej., la patente Estadounidense No. 6.620.918), sin embargo, a menudo se observa que hay que jugar desfavorablemente con el compromiso entre el rendimiento de monómero y la eliminación del agregado. En una reciente revisión de métodos de eliminación de agregados de soluciones de anticuerpos monoclonales, se señaló que en lo que se refiere a un modo de cromatografía de unión y elución "la cromatografía de intercambio catiónico puede servir para separar agregados y monómeros, si bien puede resultar difícil de desarrollar una etapa de alto rendimiento con una alta capacidad." Véase, p.ej., Aldington et al., *J. Chrom. B*, 848 (2007) 64-78.

40 En comparación con los métodos de unión y elución y los métodos de cromatografía de exclusión por tamaño, conocidos en la técnica, la purificación de proteínas en el modo de flujo continuo se considera más deseable por resultar más económico, sencillo y suponer un ahorro de tiempo y de tampón.

45 En la técnica anterior, se han realizado varias tentativas para implementar la eliminación de agregados por flujo continuo basadas en medios de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC por sus siglas en inglés) (véase, p.ej., la patente de Estados Unidos No. 7.427.659). Sin embargo, las separaciones preparativas basadas de HIC tienen un limitado potencial de aplicación ya que por lo general es difícil desarrollar un proceso, presentan una ventana operativa limitada y se requiere una alta concentración de sal en el tampón.

50 La cromatografía de partición débil (WPC por sus siglas en inglés) es otro modo de operación cromatográfica en la que el producto se une más débilmente que en el caso de la cromatografía de unión-elución, pero con más fuerza que en el caso de la cromatografía de flujo continuo (véase, p.ej., patente de Estados Unidos No. 8.067.182); sin embargo, WPC conlleva también ciertos inconvenientes asociados entre los que se incluyen una ventana operativa limitada y una capacidad de unión inferior para la eliminación de impurezas en comparación con los métodos de

unión y elución.

Aunque se ha notificado que algunos de los métodos de flujo continuo descritos en la técnica anterior sirven para unir agregados, parece ser que la especificidad para la unión de agregados con respecto al producto de interés es baja. Por otra parte, no parece que exista ningún método conocido en la técnica anterior que presente una alta especificidad de unión de agregados de proteína de orden inferior, tales como p.ej., dímeros, trímeros o tetrámeros.

### Sumario de la invención

Se divulgan composiciones nuevas y mejoradas, así como métodos de flujo continuo, en los que se utilizan dichas composiciones para separar un producto de interés, p.ej., un anticuerpo terapéutico o una proteína monomérica de agregados de proteínas en una composición biofarmacéutica. Las composiciones y métodos descritos en el presente documento son especialmente útiles para separar una proteína monomérica de interés de agregados de proteínas de orden inferior, tales como, p.ej., dímeros, trímeros y tetrámeros, que por lo general resultan difíciles de separar de la proteína monomérica.

La presente invención se basa al menos en parte en la mayor selectividad de unión de los agregados de proteína en comparación con el producto de interés (es decir, molécula monomérica) a una superficie en un modo de flujo continuo, en virtud de lo cual se separan los agregados de proteína del producto de interés. La presente invención puede llevar esto a cabo gracias a su diseño único de superficie que tiene una densidad determinada de los grupos de unión de intercambio catiónico, facilitando así la unión de un mayor número de agregados de proteínas a la superficie, en comparación con las moléculas monoméricas.

En ciertas realizaciones de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de cromatografía de flujo continuo para separar una proteína monomérica de interés de agregados de proteína en una muestra, en el que dicho método comprende el contacto de la muestra con un soporte sólido que comprende uno o más grupos de unión de intercambio catiónico fijados, a una densidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mM, en el que el soporte sólido une selectivamente agregados de proteína en virtud de lo cual se separa la proteína monomérica de interés de los agregados de proteína.

En algunas realizaciones, el soporte sólido utilizado en los métodos de acuerdo con la presente invención se selecciona entre una resina cromatográfica, una membrana, un monolito poroso, una tela tejida y una tela no tejida.

En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende una resina cromatográfica o una perla porosa.

En algunas realizaciones, el soporte sólido es una perla polimérica de poliéter vinílico porosa o una perla de polímero de polimetacrilato reticulado porosa.

En varias realizaciones, la resina cromatográfica o la perla porosa comprende un tamaño de partícula medio de aproximadamente 50 micrómetros, o entre aproximadamente 10 y aproximadamente 500 micrómetros, o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 140 micrómetros, o entre aproximadamente 30 y aproximadamente 70 micrómetros.

En algunas realizaciones, un soporte sólido se selecciona entre una resina cromatográfica o una perla porosa en las que el tamaño de partícula medio está comprendido entre 10 micrómetros y 500 micrómetros, o entre 20 y 200 micrómetros, o entre 20 y 90 micrómetros. En una realización en particular, la resina cromatográfica o perla porosa tiene un tamaño de partícula medio de aproximadamente 50 micrómetros. En general, se puede mejorar la selectividad disminuyendo el tamaño de partícula. Las personas especializadas en la técnica entenderán que es posible ajustar el tamaño de partícula medio al mismo tiempo que se mantiene cierto nivel de selectividad para la unión de agregados de proteína sobre la base de las necesidades de una aplicación o un proceso específico.

En algunas realizaciones, los agregados de proteína son agregados de proteína de orden inferior, como por ejemplo dímeros, trímeros y tetrámeros.

En otras realizaciones, los agregados de proteína son agregados de proteína de orden superior como, por ejemplo, pentámeros y de orden superior.

En algunas realizaciones, el grupo de intercambio catiónico utilizado en los métodos de acuerdo con la presente invención se selecciona del grupo que consiste en un grupo sulfónico, un grupo sulfato, un grupo fosfónico, un grupo fosfórico, y un grupo carboxílico

En algunas realizaciones, la proteína monomérica es un anticuerpo. En una realización en particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones, la proteína monomérica es una proteína recombinante, p.ej., una proteína de fusión Fc. En otras realizaciones más, la proteína monomérica es una molécula no anticuerpo.

5 En algunas realizaciones de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de cromatografía de flujo continuo para separar una proteína monomérica de interés de agregados de proteína en una muestra, en el que dicho método comprende el contacto de la muestra con un soporte sólido que comprende uno o más grupos de unión de intercambio catiónico fijados a una densidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mM, en el que el soporte sólido une los agregados de proteína en relación con los monómeros a una selectividad superior a aproximadamente 10, en virtud de lo cual se separa la proteína de interés de los agregados de proteína.

10 En otras realizaciones, se proporciona un método de cromatografía de flujo continuo para reducir la concentración de agregados de proteína en una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de: (a) proporcionar una muestra que comprende una proteína de interés y de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 % de agregados de proteína; (b) poner en contacto la muestra con un soporte sólido que comprende uno o más grupos de unión de intercambio catiónico fijados, a una densidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mM; y (c) recoger un efluente de flujo continuo de la muestra, en el que se reduce la concentración de los agregados de proteína en el efluente en al menos un 50 % en relación con la concentración de los agregados en (a), reduciendo así la concentración de los agregados de proteína en la muestra.

15 En algunas realizaciones de acuerdo con los métodos de la presente invención, la concentración de la proteína de interés en el efluente es al menos 80 % de la concentración de la proteína de interés en (a).

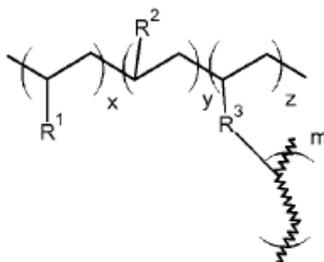
20 En algunas realizaciones, la conductividad iónica de la muestra que contiene agregados que se pone en contacto con dicho soporte sólido se encuentra dentro de un intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mS/cm.

25 En algunas realizaciones, un proceso para la purificación de una proteína de interés (p.ej., un anticuerpo monoclonal) descrito en el presente documento no requiere una etapa de cromatografía de intercambio catiónico de unión y elución. Por consiguiente, dicho proceso elimina la necesidad de añadir una sal a la solución de elución y el uso de posteriores etapas de dilución.

30 En algunas realizaciones, se proporciona un proceso para la purificación de una proteína de interés (p.ej., un anticuerpo monoclonal), en el que el proceso no requiere un aumento de la conductividad. Por consiguiente, dicho proceso no requiere la dilución tras la etapa de intercambio catiónico para reducir la conductividad antes de realizar la posterior etapa de intercambio aniónico de flujo continuo.

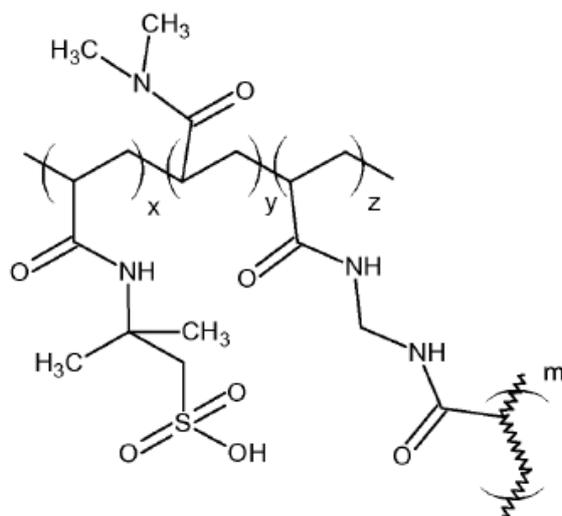
35 La presente invención abarca también polímeros que comprenden grupos de intercambio catiónico, en los que los polímeros están fijados a un soporte sólido.

Se describe un polímero que comprende la siguiente estructura química:



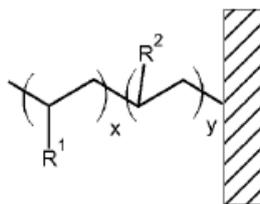
40 en la que R<sup>1</sup> es un grupo de intercambio catiónico; R<sup>2</sup> es cualquier radical orgánico alifático o aromático que no contiene un grupo cargado; R<sup>3</sup> es cualquier engarce orgánico alifático o aromático sin carga entre dos o más cadenas poliméricas cualquiera; "x", "y" y "z" son fracciones molares promedio de cada monómero en el polímero, en las que y>x; el símbolo m representa que está fijada una cadena de polímero similar en el otro extremo del engarce.

45 Se describe un polímero que comprende la siguiente estructura química:



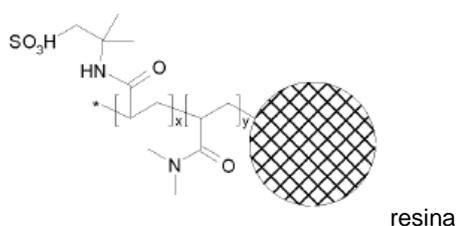
en la que "x", "y" y "z" son fracciones molares promedio de cada monómero del polímero, en las que  $y > x$ ; y el símbolo  $m$  representa que está fijado a una cadena de polímero similar en el otro extremo del engarce.

- 5 Se describe un polímero que comprende la siguiente estructura química, en la que el polímero está injertado a través de un enlace covalente en un soporte sólido:



- 10 en la que  $R^1$  es un grupo de intercambio catiónico;  $R^2$  es cualquier radical orgánico alifático o aromático que no contiene un grupo cargado; y "x" e "y" son fracciones molares promedio de cada monómero en el polímero, en las que  $y > x$ .

- 15 En algunas realizaciones, un polímero de acuerdo con la presente invención comprende la siguiente estructura química:



en la que "x" e "y" son fracciones molares promedio de cada monómero en el polímero, en las que  $y > x$  y en el que el polímero está injertado a través de una unión en una resina cromatográfica.

- 20 En varias realizaciones, los polímeros están fijados en un soporte sólido.

- 25 En varias realizaciones de acuerdo con la presente invención, se somete el efluente que contiene el producto de interés a uno o más de los métodos de separación descritos en el presente documento, en el que el efluente contiene menos de 20 %, o menos de 15 %, o menos de 10 %, o menos de 5 %, o menos de 2 % agregados de proteína.

- 30 En algunas realizaciones de acuerdo con la presente invención, los métodos y/o composiciones de la presente invención se pueden utilizar en combinación con una o más entre: cromatografía de Proteína A, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad por metal inmovilizado, cromatografía por exclusión de tamaño, diafiltración, ultrafiltración, filtración de eliminación viral, cromatografía de intercambio aniónico y/o cromatografía de intercambio catiónico.

En algunas realizaciones, los agregados de proteína que se eliminan selectivamente mediante las composiciones descritas en el presente documento son agregados de peso molecular superior, es decir pentámeros de proteína y de orden superior.

5 En algunas realizaciones, los agregados de proteína que se eliminan selectivamente mediante las composiciones descritas en el presente documento comprenden especies de agregados de orden inferior, tales como dímeros, trímeros y tetrámeros de proteína.

10 En algunas realizaciones, se usan los soportes sólidos que comprenden uno o más grupos de unión de intercambio catiónico descritos en el presente documento en una etapa del proceso de purificación de flujo continuo en un proceso de purificación, en la que la etapa del proceso de purificación de flujo continuo, así como todo el proceso de purificación, se pueden realizar de manera continua.

15 En algunas realizaciones, se conectan los soportes sólidos descritos en el presente documento para que estén en comunicación fluida con otros tipos de medio tanto corriente arriba como corriente abajo del soporte sólido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se conecta un soporte sólido que comprende uno o más grupos de unión de intercambio catiónico, tal como se describe en el presente documento, con un medio de cromatografía de intercambio aniónico corriente arriba y un medio de filtración de virus corriente abajo desde el soporte sólido. En una realización en particular, fluye una muestra a través de carbón activado seguido de un medio de cromatografía de intercambio aniónico seguido de un soporte sólido que comprende uno o más grupos de unión de intercambio catiónico seguido de un filtro de virus. En algunas realizaciones, se coloca una mezcladora estática y/o un tanque de compensación entre el medio de intercambio aniónico y el soporte sólido que comprende uno o más grupos de unión de intercambio catiónico, para realizar un cambio de pH.

25 En todos los casos, se pueden combinar las diversas realizaciones entre sí, a no ser que sean técnicamente incompatibles o se contradigan unas a otras. Por ejemplo, las realizaciones descritas en relación con los métodos en particular se pueden utilizar en combinación con otros procesos descritos en el presente documento. Asimismo, los distintos productos y sus características son útiles en los métodos y productos que se describen en el presente documento en particular.

30

### Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1 es una representación esquemática de una mejor selectividad de agregados utilizando una composición que tiene una densidad menor de grupos de unión de intercambio catiónico en comparación con una composición conocida en la técnica.

40 Las Figuras 2A-2F son estructuras químicas representativas de varias de las composiciones que abarca la presente invención. Las figuras 2A-2D representan estructuras poliméricas reticuladas inmovilizadas sobre un soporte sólido; las Figuras 2E-2H representan estructuras poliméricas injertadas fijadas covalentemente a un soporte sólido.  $R^1$  es un grupo de intercambio catiónico como p.ej., grupo sulfónico, sulfato, fosfórico, fosfónico o carboxílico;  $R^2$  es cualquier radical orgánico alifático o aromático que no contiene un grupo cargado;  $R^3$  es un engarce orgánico alifático o aromático sin carga entre dos o más cadenas poliméricas cualquiera; "x", "y" y "z" son fracciones molares promedio de cada monómero en el polímero, en las que  $y > x$ ; el símbolo  $m$  representa que está fijada una cadena de polímero similar en el otro extremo del engarce;  $R^4$  es NH o O;  $R^5$  es un grupo alifático o aromático lineal o ramificado como  $-CH_2-$ ,  $-C_2H_4-$ ,  $-C_3H_6-$ ,  $-C(CH_3)_2-CH_2-$ ,  $-C_6H_4-$ ;  $R^6$  es un grupo alifático o aromático lineal o ramificado sin cargar que contiene un engarce NH, O o S para la cadena de polímero; y  $R^7$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en uno o más radicales orgánicos alifáticos y aromáticos seleccionados independientemente del grupo que consiste en uno o más radicales orgánicos neutros y que puede contener heteroátomos como O, N, S, P, F, Cl y similares.

50 La Figura 3A es un gráfico en el que se representan los resultados de un análisis de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) de fracciones de un anticuerpo monoclonal (MAb I) pasado a través de tres dispositivos de membrana diferentes, que consisten en membrana 7, Membrana 8 o una membrana disponible en el mercado (membrana Pall Mustang® S). En el eje de las x, se muestra la carga de MAb I total sobre la membrana en g/l y, en el eje de las y, se muestra la concentración relativa de monómero MAb I (representado por el % de rendimiento) en comparación con la concentración de partida.

55 La Figura 3B es un gráfico en el que se representan los resultados de un análisis de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) de fracciones de MAb I pasadas a través de tres dispositivos de membrana que consiste en Membrana 7, Membrana 8 o membrana Pall Mustang® S. En el eje de las x, se muestra la carga total de MAb I sobre la membrana en g/l y, en el eje de las y, se muestra la concentración relativa de dímero MAb (representado por el % de rendimiento) en comparación con la concentración de partida. Tal como se observa, el dímero atraviesa la membrana 7 significativamente más tarde en comparación con la membrana 8 y la membrana Pall Mustang® S.

60 La Figura 3C es un gráfico en el que se representan los resultados de un análisis de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) de fracciones de MAb I que pasan a través de tres dispositivos de membrana, que contienen Membrana 7, Membrana 8 o membrana Pall Mustang® S. En el eje de las x, se muestra la carga total de MAb I en la membrana en g/l; en el eje de las y se muestra el rendimiento de agregado de alto peso molecular (HMW) de MAb I en comparación con la concentración de partida. Tal como se observa, HMW atraviesa la Membranas 7

65

significativamente más tarde que la Membrana 8 y la membrana Pall Mustang® S.

La Figura 4A es un gráfico en el que se representa el paso sin retención de agregados, según se mide por SEC (mostrado en el eje de las y, a la derecha), para una reserva de anticuerpos para la Membrana 7 (que se muestra con triángulos blancos) y la Membrana 8 (se muestra en cuadrados blancos) en función de la carga de MAb.

La Figura 4B es un gráfico en el que se representa el paso sin retención de agregados (se muestra en el eje de las y a la derecha) para una reserva de anticuerpos para la Membrana 7 para 2 ciclos por separado (ciclo 1: se muestra con círculos blancos; ciclo 2: se muestra en rombos blancos) en función de la carga de MAb. También se muestra, el rendimiento de monómero en la reserva para la Membrana 7 (ciclo 1: se muestra con círculos oscuros; ciclo 2: se muestra con rombos negros).

La Figura 5 es un gráfico en el que se representa el paso sin retención de agregados (se muestra en el eje de las y, a la derecha) para una reserva de anticuerpos para la Membrana 7 en función de la carga de MAb III (se muestra en el eje de las x como mg/ml). Se muestra también el rendimiento de monómero en la reserva para la Membrana 7 (se muestra en el eje de las y a la izquierda).

La Figura 6A es un gráfico en el que se representan los coeficientes de partición a un pH 5,0 en función de la concentración de NaCl para la unión de monómeros MAb I a la Membrana 8 (cuadrados blancos) y agregados MAb I a la Membrana 8 (triángulos blancos), monómeros MAb I a la Membrana 7 (cuadrados negros) y agregados MAb I a la Membrana 7 (triángulos cerrados).

La Figura 6B es un gráfico en el que se representa los coeficientes de partición a un pH 5,0 en función de la concentración de NaCl para la unión de monómeros MAb II a la Membrana 8 (cuadrados blancos) y agregados MAb II a la Membrana 8 (triángulos blancos), monómeros MAb II a la Membrana 7 (cuadrados cerrados) y agregados MAb II a la Membrana 7 (triángulos cerrados).

La Figura 7 es un gráfico en el que se representan las gráficas de la selectividad para la unión de MAb I y MAb II a las Membranas 7 y 8, respectivamente, a un pH 5,0. La selectividad de Membrana 8 para MAb I se muestra con los cuadrados blancos; la selectividad de Membrana 7 para MAb I se muestra con cuadrados negros; la selectividad de la Membrana 8 para MAb II se muestra con triángulos blancos; y la selectividad de la Membrana 7 para MAb II se muestra con los triángulos negros.

La Figura 8 representa un gráfico en el que se indica el porcentaje de monómero con cargas de agregado de 10 y de 15 g/l.

La Figura 9 representa un gráfico en el que se indica la región de operación óptima (se muestra en blanco) a cargas de agregado de 5, 10 y 15 g/l. Óptimo se definió como > 88 % de rendimiento de monómero con el < 2 % de agregado restante para completar el total de proteína. Las regiones en gris no satisfacen estos criterios.

La Figura 10 es un gráfico en el que se representan los resultados de un experimento para investigar el efecto del caudal en la tasa de transferencia del dispositivo de filtración de virus. El eje de las y representa la caída de presión (psi) y el eje de las x representa la tasa de transferencia del dispositivo de filtración del virus (kg/m<sup>2</sup>).

La Figura 11 es una representación esquemática del proceso de purificación por flujo continuo conectado en el que se emplean las composiciones descritas en el presente documento. Se conecta un dispositivo que contiene carbón activado directamente a un dispositivo de intercambio aniónico. El efluente del dispositivo de intercambio aniónico pasa a través de una mezcladora estática, en la que se añade un ácido acuoso para reducir el pH y, a continuación, pasa a través de un dispositivo de flujo continuo de intercambio catiónico, de acuerdo con la presente invención, y un filtro de virus.

La Figura 12 es un gráfico en el que se representan los resultados de un experimento para medir el paso sin retención de HCP tras un medio de cromatografía de intercambio aniónico (ChromaSorb™). El eje de las x representa la concentración de HCP (ppm) y el eje de las y representa la carga de AEX (kg/l).

La Figura 13 es un gráfico en el que se representan los resultados de un experimento para medir la eliminación de agregados de MAb en función de la carga del dispositivo de filtración de virus en la etapa del procedimiento de purificación de flujo continuo. El eje de las x representa la carga de filtración de virus (kg/m<sup>2</sup>) y el eje de las y representa el porcentaje de agregados de MAb en la muestra tras la filtración del virus.

La Figura 14 es un gráfico en el que se representan los resultados de un experimento para demostrar la eliminación de agregados MAb en función de la carga de proteína acumulativa utilizando una resina de intercambio catiónico, tal como se describe en el presente documento (Lote no.12LPDZ119). El eje de las x representa la carga de proteína acumulativa en mg/ml, el eje de las y a la izquierda representa la concentración de anticuerpo MAb en mg/ml y el eje de las y a la derecha representa el porcentaje de agregados de MAb en la muestra.

La Figura 15 es un gráfico en el que se representan los resultados de un experimento para demostrar la eliminación de agregados de MAb en función de la carga de proteína acumulativa, utilizando una resina de intercambio catiónico, tal como se describe en el presente documento (Lote no. 12LPDZ128). El eje de las x representa la carga de proteína acumulativa en mg/ml, el eje de las y a la izquierda representa la concentración del anticuerpo MAb en mg/ml y el eje de las y a la derecha representa el porcentaje de agregados de MAb en la muestra.

La Figura 16 es un gráfico en el que se representan los resultados de un experimento para demostrar la eliminación de agregados MAb en función de la carga de proteína acumulativa, utilizando la resina de intercambio catiónico tal como se describe en el presente documento (Lote no. 12LPDZ129). El eje de las x representa la carga de proteína acumulativa en mg/ml, el eje de las y a la izquierda representa la concentración del anticuerpo MAb en mg/ml y el eje de las y a la derecha representa el porcentaje de agregados MAb en la

muestra.

Figure 17 representa el cromatograma de la resina Lote nº 1712 con MAb5 a pH 5 y un tiempo de residencia de 3 minutos.

## 5 Descripción detallada de la invención

En la técnica anterior se han descrito diversos métodos de unión y elución, así como de flujo continuo, para intentar separar agregados de proteína de proteínas monoméricas, que son productos de interés por lo general.

10 Los métodos de unión y elución por lo general consumen tiempo y requieren el desarrollo de un proceso de envergadura y a veces no resultan eficaces para separar los agregados y, en particular, los agregados de orden inferior, de una proteína monomérica, al mismo tiempo que se mantiene un alto rendimiento de la proteína monomérica. Se han descrito ciertos métodos de flujo continuo de intercambio catiónico dentro de la técnica, tanto  
15 con resinas porosas convencionales como con membranas; sin embargo, quedan cuestiones por resolver como la baja capacidad de los medios para la unión de agregados, la baja selectividad de los dímeros y, a menudo, el bajo rendimiento del producto de interés, es decir, las proteínas monoméricas (véase p.ej., Liu et al., J. Chrom. A., 1218 (2011), 6943-6952).

20 Por otra parte, dentro de la técnica anterior, se han descrito métodos en los que se emplea un grupo de intercambio catiónico sobre soportes sólidos para separar proteínas. Véase, p.ej., Wu et al. (Effects of stationary phase ligand density on high-performance ion-exchange cromatografía of proteínas, J. Chrom. 598 (1992), 7-13), en el que se explica la alta densidad de grupos de intercambio catiónico sobre un soporte sólido para conseguir la mejor resolución cromatográfica de dos proteínas modelo. No obstante, recientemente, se ha investigado concretamente el efecto de la densidad de grupos de unión de intercambio catiónico sobre la eliminación de agregados (véase, p.ej.,  
25 Fogle et al., Effects of resin ligand density on yield and impurity clearance in preparative cation exchange cromatografía. I. Mechanistic evaluation, J. Chrom. A. 1225 (2012), 62-69). Se ha notificado que, en gran medida, la resolución de formas de anticuerpo de alto peso molecular y monoméricas no depende de la densidad de grupos de unión.

30 Asimismo, se ha descrito WPC para su uso en la eliminación de impurezas (véase, p.ej., Suda et al., Comparison of agarose and dextran-grafted agarose strong ion exchangers for the separation of agregados de proteína, J. Chrom. A, 1216: pp.5256-5264, 2009). En el caso de cromatografía de partición débil (WPC), el coeficiente de partición,  $K_p$ , oscila entre 0,1 y 20; un  $K_p > 20$  está asociado con cromatografía de unión-elución y un  $K_p < 0,1$  está asociado con cromatografía de flujo continuo. WPC tiene al menos dos graves inconvenientes. En primer lugar, una región operativa limitada ( $0,1 < K_p < 20$ ), que tiene que estar entre la cromatografía de flujo continuo y la unión-elución (véase, p.ej., la patente estadounidense No. 8.067.182). Dentro de esta región operativa, debe haber una alta selectividad entre el producto y las impurezas para que la separación sea eficiente. Normalmente, para los medios de intercambio iónico, la selectividad entre producto e impurezas aumenta a medida que aumenta el  $K_p$ , obteniéndose la selectividad más alta en condiciones de unión-elución. En segundo lugar, la capacidad para las  
35 impurezas es inferior que en el caso del modo unión-elución. Dado que los valores  $K_p$  son más bajos, también lo será la capacidad en condiciones de operación normales, en las que las concentraciones de impurezas son más bajas que las del producto.

45 La presente invención sirve para conseguir una separación superior de agregados de proteína y proteínas monoméricas, en comparación con los distintos métodos descritos en la técnica. Una característica distintiva de la presente invención con respecto a los métodos descritos en la técnica anterior es el uso de la baja densidad de grupos de intercambio catiónico sobre un soporte sólido, así como la alta especificidad para la eliminación de agregados de proteína de orden inferior, p.ej., dímeros, trímeros y tetrámeros, que resultan normalmente más difíciles de eliminar debido a la proximidad de su tamaño con el del monómero y sus características superficiales.

50 Para poder entender mejor la presente invención, se definirán en primer lugar algunos términos. Otras definiciones quedarán expuestas a lo largo de la descripción detallada.

### I. Definiciones

55 El término "cromatografía," tal como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier tipo de técnica que separa el producto de interés (p.ej., proteína terapéutica o anticuerpo) de contaminantes y/o agregados de proteína en una preparación biofarmacéutica.

60 Los términos "proceso de flujo continuo" o "modo de flujo continuo", y "cromatografía de flujo continuo", tal como se utilizan indistintamente en el presente documento, se refieren a una técnica de separación de producto en la que se pretende que fluya una preparación biofarmacéutica que contiene el producto de interés a través de un material. En algunas realizaciones, el producto de interés fluye a través del material y las entidades no deseables se unen al material. En una realización en particular, el material contiene cierta densidad de grupos de unión de intercambio catiónico (es decir, más baja que las de las composiciones de la técnica anterior) y se utiliza para separar una  
65 proteína monomérica de agregados de proteína, en el que la proteína monomérica fluye a través del material, al

mismo tiempo que los agregados de proteína se unen al material.

El término "cromatografía de afinidad" se refiere a una técnica de separación de proteínas en las que la molécula diana (p.ej., una región Fc que contiene la proteína o el anticuerpo de interés) se une específicamente a un ligando que es específico para la molécula diana. Dicho ligando se denomina generalmente ligando bioespecífico. En algunas realizaciones, el ligando bioespecífico (p.ej. una Proteína A o una variante funcional de la misma) se une covalentemente a un material de matriz de cromatografía adecuado y es accesible para la molécula diana en solución cuando la solución entra en contacto con la matriz de cromatografía. La molécula diana retiene por lo general su afinidad de unión específica para el ligando bioespecífico durante las etapas cromatográficas, mientras que los demás solutos y/o proteínas en la mezcla no se unen apreciablemente o específicamente al ligando. La unión de la molécula diana al ligando inmovilizado permite que las proteínas contaminantes y las impurezas pasen a través de la matriz de cromatografía, al tiempo que la molécula diana permanece específicamente unida al ligando inmovilizado sobre el material en fase sólida. La molécula diana específicamente unida se elimina después en su forma activa desde el ligando inmovilizado en condiciones adecuadas (p.ej., pH bajo, pH alto, alto contenido de sal, ligando de competición etc.) y pasa a través de una columna cromatográfica con el tampón de elución, sustancialmente desprovista de las proteínas contaminantes e impurezas que se habían dejado pasar anteriormente a través de la columna. Debe entenderse que es posible utilizar cualquier ligando adecuado para purificar sus proteínas de unión específicas correspondientes, p.ej., anticuerpo. En algunas realizaciones de acuerdo con la presente invención, se utiliza la proteína A como ligando para una proteína diana que contiene una región Fc. Las personas especializadas en la técnica podrán determinar fácilmente las condiciones para la elución del ligando bioespecífico (p.ej. Proteína A) de la molécula diana (p.ej. una proteína que contiene región Fc). En algunas realizaciones, se puede utilizar la proteína G o la proteína L o una variante funcional de las mismas como ligando bioespecífico. En algunas realizaciones, se utiliza en el proceso en el que se emplea un ligando bioespecífico, como Proteína A, un pH dentro del intervalo de 5-9 para la unión a la proteína que contiene la región Fc, seguido del lavado y re-equilibrio del ligando bioespecífico /conjugado de molécula diana, que va seguido después de elución con un tampón que tiene un pH de aproximadamente 4 o inferior que contiene al menos una sal.

Los términos "contaminante" "impureza," y "residuos," tal como se utilizan en el presente documento indistintamente se refieren a cualquier molécula extraña y objetable, incluyendo una macromolécula biológica como ADN, un ARN, una o más proteínas de célula huésped, endotoxinas, lípidos, agregados de proteína y uno o más aditivos que pueden estar presentes en una muestra que contiene el producto de interés que se está separando de una o más de las moléculas extrañas u objetables. Asimismo, dicho contaminante puede incluir cualquier reactivo utilizado en una etapa que puede tener lugar antes del proceso de separación. En una realización en particular, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento tienen por objeto para eliminar selectivamente agregados de proteína de una muestra que contiene un producto de interés.

Los términos "inmunoglobulina", "Ig" o "anticuerpo" (que se utilizan indistintamente en el presente documento) se refieren a una proteína que tiene una estructura de cadena de cuatro polipéptidos básica que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, estando estabilizadas dichas cadenas, por ejemplo, por enlaces disulfuro de intercadena, que tiene la capacidad de unirse específicamente a antígeno. Las expresiones "inmunoglobulina de cadena simple" o "anticuerpo de cadena simple" (que se utilizan indistintamente en el presente documento) se refieren a una proteína que tiene una estructura de cadena de dos polipéptidos que consiste en una cadena pesada y una ligera, estando estabilizadas dichas cadenas, por ejemplo, por engarces de péptido intercadena, que tiene la capacidad de unirse específicamente a antígeno. El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena pesada o ligera que comprende bucles de péptido (p.ej. que comprende 3 o 4 bucles de péptido) estabilizados, por ejemplo, por una hoja plegada  $\beta$  y/o un enlace disulfuro intercadena. Asimismo, se puede hacer referencia en el presente documento a los dominios como "constante" o "variable" sobre la base de la relativa falta de variación de secuencia dentro de los dominios de varios miembros de la clase en el caso de un dominio "constante" o la significativa variación dentro de los dominios de varios miembros de la clase en el caso de un dominio "variable". Generalmente, en la técnica se hace referencia indistintamente a "dominios" de anticuerpo o polipéptido y a "regiones" de anticuerpo o polipéptido. Se hace referencia indistintamente a dominios "constantes" de cadenas ligeras de anticuerpo y a "regiones constantes de cadena ligera", "dominios constantes de cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Se hace referencia indistintamente a dominios "constantes" de cadena pesada de anticuerpo y a "regiones constantes de cadena pesada", "dominios constantes de cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH". Se hace referencia indistintamente a dominios "variables" de cadenas ligeras de anticuerpo y a "regiones variables de cadena ligera", "dominios variables de cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL". Se hace referencia indistintamente a dominios "variables" de cadenas pesadas de anticuerpo y a "regiones variables de cadena pesada", "dominios variables de cadena pesada", regiones "VH" o dominios "VH".

Las inmunoglobulinas o los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden existir en forma monomérica o polimérica, por ejemplo, anticuerpos IgM que existen en forma pentámera y/ anticuerpos IgA que existen en forma monomérica, dimérica o multimérica. El término "fragmento" se refiere a una parte o una porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos restos de aminoácido que un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos pueden obtenerse por tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o una cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos se pueden obtener también por medios recombinantes. Entre los ejemplos de fragmentos se incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc y/o Fv.

La expresión "fragmento de unión a antígeno" se refiere a una porción de polipéptido de una inmunoglobulina o un anticuerpo que se une a un antígeno o compite con un anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que se derivan) para la unión de antígeno (es decir, unión específica). Los fragmentos de unión se pueden producir a través de técnicas de ADN recombinante o escisión química o enzimática de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, cadenas simples y anticuerpos de cadenas simples.

El término "preparación biofarmacéutica" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una composición que contiene un producto de interés (p.ej., una proteína terapéutica o un anticuerpo que es normalmente un monómero) y componentes no deseados, tales como agregados de proteína (p.ej. agregados de proteína de orden inferior y agregados de alto peso molecular del producto de interés).

Tal como se utiliza en el presente documento, y a no ser que se indique de otra forma, el término "muestra" se refiere a cualquier composición o mezcla que contiene una molécula diana. Las muestras se pueden derivar de fuentes biológicas u otras fuentes. Las fuentes biológicas incluyen fuentes eucariotas y procariotas, tales como células vegetales y animales, tejidos y órganos. La muestra también puede incluir diluyentes, tampones, detergentes y especies contaminantes, residuos y similares que se encuentran mezclados con la molécula diana. La muestra se puede estar "parcialmente purificada" (es decir, ha sido sometida a una o más etapas de purificación, como por ejemplo etapas de filtración) o se puede obtener directamente de un organismo o célula huésped que produce dicha molécula diana (p.ej., la muestra puede comprender fluidos de cultivo de células recogidas). En algunas realizaciones, la muestra es un alimento de cultivo celular. En algunas realizaciones, la muestra que se somete a los procesos de purificación de fluido continuo descritos en el presente documento es un eluato de una etapa de cromatografía de unión y elución, p.ej. una cromatografía de afinidad de Proteína A.

La expresión "agregado de proteína " o "agregados de proteína," tal como se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere a una asociación de al menos dos moléculas de un producto de interés, p.ej., una proteína o anticuerpo terapéutico. La asociación de al menos dos moléculas de un producto de interés puede producirse a través de cualquier medio, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, unión covalente, no covalente, disulfuro o reticulación no reducible.

La concentración del agregado se puede medir en una muestra de proteína utilizando cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), un método muy conocido y comúnmente aceptado en la técnica (véase, p.ej., Gabrielson et al., J. Pharm. Sci., 96, (2007), 268-279). Las concentraciones relativas de especies de diversos pesos moleculares se miden en el efluente utilizando absorbancia de UV, al tiempo que los pesos moleculares de las fracciones se determinan llevando a cabo la calibración del sistema siguiendo las instrucciones del fabricante de la columna.

Los términos "dímero", "dímeros", "dímero de proteína" o "dímeros de proteína", tal como se utilizan indistintamente en el presente documento se refieren a una fracción de orden inferior de agregados de proteína que comprende predominantemente agregados que contienen dos moléculas monoméricas, pero que pueden también contener cierta cantidad de trímeros y tetrámeros. Esta fracción se observa normalmente como el primer pico de resolución en un cromatograma SEC inmediatamente antes del pico del monómero principal.

La expresión "agregados de alto peso molecular" o "HMW", tal como se utilizan indistintamente en el presente documento, se refiere a una fracción de orden superior de agregados de proteína, es decir, pentámera y superior. Esta fracción se observa normalmente como uno o más picos en un cromatograma SEC antes del pico del dímero.

Los términos "grupo de unión" o "ligando" tal como se utilizan indistintamente en el presente documento se refieren a una estructura química específica inmovilizada sobre un soporte sólido (p.ej., una superficie porosa) que es capaz de atraer una proteína monomérica o agregados de proteína desde una solución. La atracción de la proteína al grupo de unión puede ser de cualquier tipo incluyendo iónica, polar, dispersiva, hidrofóbica, afinidad, quelación de metal o van der Waals.

La expresión "grupo de unión de intercambio catiónico", tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un grupo de unión de carga negativa. En una realización en particular, el grupo de unión es un grupo sulfonato cargado negativamente.

El término "soporte sólido" se refiere en general a cualquier material (poroso o no poroso) en el que se fijan los grupos de unión. La fijación de los grupos de unión en el soporte sólido puede tener lugar a través de un enlace covalente, como por ejemplo en el caso de un injerto, o por revestimiento, adhesión, adsorción y mecanismos similares. Entre los ejemplos de soportes sólidos utilizados en los métodos y composiciones descritos en el presente documento se incluyen, sin limitarse a ellos, membranas, perlas porosas, fibras de malla al azar, monolitos y resinas.

El término "densidad" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la concentración de los grupos de unión o ligandos sobre el soporte sólido, que se expresa generalmente como concentración de ligando en moles por litro de medio poroso. Una unidad comúnmente aceptada de densidad de ligando de intercambio iónico es mili-equivalentes por litro, o meq/l (equivalente a µeq/ml), que se corresponde con la cantidad molar de grupos iónicamente intercambiables en un volumen de medio dado. Para los grupos cargados con una sola fracción

ionizable, la densidad de ligando en meq/l podría ser equivalente a la densidad de estos grupos expresada en mmoles/l o mM.

5 El término "selectividad" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una relación de coeficientes de partición adimensional de dos especies entre una fase móvil y una fase estacionaria. Un coeficiente de partición ( $K_p$ ) es la relación Q/C, en la que Q y C son respectivamente las concentraciones de proteína unida y libre.

10 Las expresiones "etapa de proceso" o "operación unitaria", tal como se utilizan indistintamente en el presente documento, se refieren al uso de uno o más métodos o dispositivos para conseguir un resultado determinado en un proceso de purificación. Entre los ejemplos de etapas de proceso u operaciones unitarias que se pueden emplear se incluyen, pero sin limitarse a ellas, aclarado, cromatografía de unión y elución, inactivación de virus, purificación de flujo continuo y formulación. Ha de entenderse que cada una de las etapas de proceso u operaciones unitarias puede incluir más de una etapa o método o dispositivo para conseguir el resultado pretendido de esa etapa de proceso u operación unitaria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la etapa de aclarado y/o la etapa de purificación de flujo continuo pueden incluir más de una etapa o método o dispositivo para conseguir esa etapa de proceso u operación unitaria. En algunas realizaciones, el uno o más dispositivos utilizados para realizar la etapa de proceso u operación unitaria son dispositivos de un solo uso y se pueden eliminar y/o reemplazar sin tener que reemplazar ningún otro dispositivo en el proceso ni sin tener siquiera que detener el ciclo del proceso.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tanque de reserva" se refiere a cualquier contenedor, recipiente, reserva, tanque o bolsa, utilizado normalmente entre las etapas del procedimiento y que tiene un tamaño/volumen adecuado para permitir la recogida de todo el volumen de producción de una etapa del proceso. Los tanques de reserva se pueden utilizar para retener o almacenar o manipular las condiciones de la solución de todo el volumen de producción de una etapa del proceso. En varias realizaciones de acuerdo con la presente invención, el proceso obvia la necesidad de usar uno o más tanques de reserva.

En algunas realizaciones, el proceso descrito en el presente documento puede utilizar uno o más tanques de compensación.

30 El término "tanque de compensación" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier contenedor o recipiente o bolsa que se utiliza entre etapas de procedimiento o dentro de una etapa de procedimiento (p.ej. cuando una sola etapa de procedimiento comprende una o más etapas); en el que la producción de una etapa fluye a través del tanque de compensación hasta la siguiente etapa. Por consiguiente, un tanque de compensación es diferente de un tanque de reserva ya que no tiene como objeto retener o recoger todo el volumen de producción de una etapa; sino que permite el flujo continuo de la producción de una etapa a la siguiente. En algunas realizaciones, el volumen de un tanque de compensación utilizado entre dos etapas del proceso o dentro de una etapa de proceso en un proceso o un sistema descrito en el presente documento no es más del 25 % de todo el volumen de la producción de la etapa de proceso. En otra realización, el volumen de un tanque de compensación no es más del 10 % de todo el volumen de la producción de una etapa de proceso. En otras realizaciones, el volumen de un tanque de compensación es menos de 35 % o menos de 30 %, o menos de 25 %, o menos de 20 %, o menos de 15 %, o menos de 10 % de todo el volumen del cultivo celular en un bio-reactor, que constituye el material de partida del que se ha de purificar las moléculas diana.

45 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, se utiliza un tanque de compensación corriente arriba de una etapa que emplea el soporte sólido descrito en el presente documento.

50 El término "proceso continuo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un proceso para purificar una molécula diana que incluye dos o más etapas de proceso (u operaciones unitarias), de manera que la producción de una etapa de proceso fluye directamente a la siguiente etapa de proceso dentro del proceso, sin interrupción y en el que se pueden realizar dos o más etapas de proceso a la vez durante al menos parte de su duración. Es decir, en caso de un proceso continuo, tal como se describe en el presente documento, no es necesario completar una etapa de proceso antes de comenzar la siguiente etapa de proceso, sino que una porción de la muestra se desplaza siempre a través de las etapas del proceso. El término "proceso continuo" también se aplica a las etapas dentro de una etapa del proceso, en cuyo caso, durante la realización de una etapa de proceso que incluye varias etapas, la muestra fluye de forma continua a través de las múltiples etapas que son necesarias para realizar la etapa del proceso. Un ejemplo de dicha etapa del proceso descrita en el presente documento es una etapa de purificación de flujo continuo que incluye varias etapas que se realizan de manera continua, p.ej., carbón activado en flujo continuo, seguido de medio AEX de flujo continuo seguido de medio CEX de flujo continuo, con la utilización de los soportes sólidos descritos en el presente documento, seguido filtración de virus de flujo continuo.

60 La expresión "matriz de intercambio aniónico" se utiliza en el presente documento para referirse a una matriz que está cargada positivamente, p.ej., que tiene uno o más ligandos cargados positivamente, como grupos amino cuaternarios, fijados. Entre las resinas de intercambio aniónico disponibles en el mercado se incluyen DEAE celulosa, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE™ (GE Healthcare). Otros ejemplos de materiales que se pueden utilizar en los procesos y sistemas descritos en el presente documento incluyen Fractogel® EMD TMAE, Fractogel® EMD TMAE highcap, Eshmuno® Q y Fractogel® EMD DEAE (EMD Millipore).

Los términos "carbón activado" o "carbón activado", tal como se utilizan indistintamente en el presente documento se refieren a un material carbonáceo que ha sido sometido a un proceso para potenciar su estructura porosa. Los carbonos activados son sólidos porosos con áreas superficiales muy altas. Se pueden derivar de diversas fuentes incluyendo, carbón, madera, cáscara de coco, cáscara de nuez y turba. El carbón activado se puede producir a partir de estos materiales por activación física que implica el calentamiento en una atmósfera controlada o activación química con ácidos fuertes, bases u oxidantes. Los procesos de activación producen una estructura porosa con áreas superficiales altas que dan al carbón activado una gran capacidad para eliminar las impurezas. Los procesos de activación se pueden modificar para controlar la acidez de la superficie. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, se utiliza carbón activado en una etapa de purificación de flujo continuo, que normalmente sigue a una etapa de cromatografía de unión y elución o una etapa de inactivación de virus que a su vez, sigue a una etapa de cromatografía de unión y elución. En algunas realizaciones, se incorpora el carbón activado dentro de un medio de celulosa, p.ej., una columna o algún dispositivo adecuado.

El término "mezcladora estática" se refiere a un dispositivo para mezclar dos materiales fluidos, normalmente líquidos. El dispositivo consiste generalmente en elementos de mezclado (elementos fijos) que están alojados en una carcasa cilíndrica (tubo). El diseño global del sistema lleva incorporado un método para suministrar dos corrientes de fluidos a la mezcladora estática. A medida que se desplazan las corrientes a través de la mezcladora, los elementos fijos combinan de forma continua los materiales. El mezclado completo depende de muchas variables, incluyendo las propiedades de los fluidos, el diámetro interior del tubo, el número de elementos de mezclado y el diseño, etc. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, se utilizan una o más mezcladoras estáticas en los procesos descritos en el presente documento. En una realización en particular, se utiliza una mezcladora estática para conseguir el cambio de solución deseado tras la etapa de cromatografía de intercambio aniónico y antes del contacto de una muestra con el soporte sólido de intercambio catiónico, tal como se describe en el presente documento.

## II. Ejemplos de soportes sólidos

La presente invención proporciona soportes sólidos que tienen una determinada densidad de grupos de unión o ligandos fijados, que unen agregados de proteína más favorablemente que la forma monomérica de una proteína que suele ser el producto de interés. Sin desear vincularse a una teoría, se contempla que es posible utilizar cualquier soporte sólido adecuado en el caso de la presente invención. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser poroso o no poroso o puede ser continuo, como por ejemplo en forma de membrana o un monolito. El soporte sólido podría ser también discontinuo, como por ejemplo en forma de partículas, perlas o fibras. En cualquiera de estos casos (continuo o discontinuo), lo importante es que el soporte sólido se caracterice por tener un área superficial alta, integridad mecánica, integridad en un entorno acuoso y capacidad para proporcionar distribución de flujo para asegurar accesibilidad de los grupos de unión.

Entre los ejemplos de soportes sólidos porosos continuos se incluyen membranas microporosas, es decir, que tienen tamaños de poro comprendidos entre aproximadamente 0,05 micrómetros y 10 micrómetros. Las membranas porosas que se pueden utilizar en las composiciones y los métodos de acuerdo con la presente invención pueden clasificarse como simétricas o asimétricas por su naturaleza, lo que se refiere a la uniformidad de los tamaños de poro a través del grosor de la membrana o, para una fibra hueca, a través de la pared microporosa de la fibra. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "membrana simétrica" se refiere a una membrana que tiene un tamaño de poro sustancialmente uniforme a través de la sección transversal de la membrana. Tal como se emplea en el presente documento, la expresión "membrana asimétrica" se refiere a una membrana en la que el tamaño de poro promedio no es constante a través de la sección transversal de la membrana. En algunas realizaciones, en el caso de membranas asimétricas, los tamaños de poro pueden variar uniformemente o de forma discontinua en función de la localización a lo largo de la sección transversal de la membrana. En algunas realizaciones, las membranas asimétricas pueden tener una relación entre los tamaños de poro en una superficie externa y los tamaños de poro de la superficie externa contraria, estando dicha relación por encima de uno sustancialmente.

En las composiciones y métodos descritos en el presente documento, se puede utilizar varias membranas microporosas fabricadas de una amplia variedad de materiales. Entre los ejemplos de dichos materiales se incluyen polisacáridos, polímeros sintéticos y semi-sintéticos, metales, óxidos de metal, cerámicas, vidrio y combinaciones de los mismos.

Entre los ejemplos de polímeros que se pueden utilizar para fabricar las membranas microporosas que se pueden utilizar en las composiciones y métodos descritos en el presente documento se incluyen, sin limitarse a ellas, poliácridamidas sustituidas o sin sustituir, poliestirenos, polimetacrilamidas, poliimididas, poliácridatos, policarbonatos, polimetacrilatos, polímeros hidrófilos de polivinilo, poliestirenos, polisulfonas, poliéster sulfonas, copolímeros de estireno y divinilbenceno, polisulfonas aromáticas, politetrafluoroetileno (PTFE), polímeros termoplásticos perfluorados, poliolefinas, poliamidas aromáticas, poliamidas alifáticas, polietilenos de peso molecular ultra-alto, difluoruro de polivinilideno (PVFG), poliéter éter cetona (PEEK) poliésteres y combinaciones de los mismos.

Entre los ejemplos de membranas microporosas disponibles en el mercado se incluyen Durapore® y Millipore Express® distribuida por EMD Millipore Corp. (Billerica, MA); Supor® distribuida por Pall Corp. (Port Washington, NY); y Sartopore® y Sartobran® distribuidas por Sartorius Stedim Biotech S.A. (Aubagne Cedex, Francia).

- 5 Otros ejemplos de soportes sólidos continuos son monolitos, como materiales monolíticos CIM® distribuidos por BIA Separations (Villach, Austria).

Entre los ejemplos de soportes sólidos discontinuos se incluyen perlas para cromatografía porosas. Las personas especializadas en la técnica reconocerán que es posible fabricar perlas para cromatografía a partir de una gran variedad de materiales poliméricos e inorgánicos, tales como polisacáridos, acrilatos, metacrilatos, poliestirénicos, ésteres vinílicos, vidrio de poro controlado, cerámicas y similares.

Entre los ejemplos de perlas para cromatografía disponibles en el mercado se incluyen GPG de EMD Millipore Corp.; Sepharose® de GE Healthcare Life Sciences AB; TOYOPEARL® de Tosoh Bioscience; y POROS® de Life Technologies.

Otros ejemplos de soportes sólidos son materiales fibrosos tejidos y no tejidos, como por ejemplo mallas de fibra y fieltros, así como fibras empaquetadas en una carcasa, por ejemplo, una columna de cromatografía, carcasa de plástico desechable y similar. Entre los ejemplos de soportes sólidos se incluyen también fibras de malla al azar.

### 20 **III. Ejemplos de grupos de unión**

Se puede fijar una gran variedad de grupos de unión o ligandos a los soportes sólidos y utilizarse para eliminar eficazmente los agregados de proteína de una muestra, tal como se describe en el presente documento. En general, el grupo de unión deberá ser capaz de atraer y unir los agregados de la proteína en una solución. La atracción de la proteína al grupo de unión puede ser de cualquier tipo, incluyendo iónica (p.ej., grupos de intercambio catiónico), polar, dispersiva, hidrofóbica, afinidad, quelación metálica o van der Waals.

Entre los ejemplos de grupos de unión iónica se incluyen, sin limitarse a ellos, sulfato, sulfonato, fosfato, fosfonato, carboxilato; amina primaria, secundaria, terciaria y amonio cuaternario; aminas heterocíclicas, como piridina, pirimidina, piridinio, piperazina y similares.

Los grupos polares incluyen una amplia variedad de entidades químicas que comprenden enlaces químicos polarizados como C-O, C=O, C-N, C=N, C=N, N-H, O-H, C-F, C-Cl, C-Br, C-S, S-H, S-O, S=O, C-P, P-O, P=O, P-H. Entre los ejemplos de grupos polares se incluyen carbonilo, carboxilo, alcohol, tiol, amida, haluro, amina, éster, éter, tioéster y similares.

Los grupos de unión hidrofóbicos son capaces de establecer interacciones hidrofóbicas. Entre los ejemplos de grupos hidrofóbicos se incluyen alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, fluoroalquilo, arilo y similares.

Los grupos de unión por afinidad son disposiciones de varias funcionalidades de unión que proporcionan coordinadamente una interacción altamente específica con la proteína diana. Entre los ejemplos de grupos de unión por afinidad se incluyen Proteína A y Proteína G y dominios y variantes de los mismos.

En algunas realizaciones, un grupo de unión preferente es un grupo iónico. En una realización en particular, un grupo de unión es un grupo sulfonato de carga negativa. En general, los grupos sulfonato de carga negativa presentan varias ventajas. Por ejemplo, presentan un amplio potencial de aplicación para unir proteínas de carga positiva en una solución; la química no resulta cara y es sencilla y se dispone de muchos métodos de fabricación y síntesis; la interacción entre el grupo de unión y las proteínas se comprende muy bien (véase, p.ej., Stein et al., J. Chrom. B, 848 (2007) 151-158) y la interacción se puede manipular fácilmente alterando las condiciones de solución y dicha interacción se puede aislar de otras interacciones.

### 55 **IV. Métodos de fijación de los grupos de unión a un soporte sólido y control de la densidad de los grupos de unión en el soporte sólido**

En las composiciones y métodos descritos en el presente documento, se fijan grupos de unión adecuados al soporte sólido, en los que se controla densidad de los grupos de unión sobre el soporte sólido de manera que se proporciona una mayor capacidad de unir agregados de proteína con respecto al producto de interés.

Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento se basan en un descubrimiento sorprendente e inesperado de que la menor densidad de los grupos de unión en un soporte sólido es más eficaz para eliminar los agregados de proteína en un modo de flujo continuo, incluso a pesar de que la técnica anterior pareciera indicar la idoneidad de tener una alta densidad de grupos de unión. Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento son especialmente eficaces en la eliminación de los agregados de proteína de orden inferior, tales como p.ej., dímeros, trímeros y tetrámeros, en un modo de flujo continuo, que por lo general resultan más difíciles de separar de la forma monomérica de proteínas, en comparación con agregados de orden superior, tales como p.ej.,

pentámeros y superiores.

Los diversos métodos conocidos en la técnica anterior, así como los descritos en el presente documento, se pueden utilizar para fijar grupos de unión a un soporte sólido para su uso en los métodos descritos en el presente documento. En general, los criterios para lograr la fijación incluyen conseguir la densidad del grupo de unión deseada y una baja tasa de desprendimiento de grupos de unión (es decir, una baja lixiviación de los grupos de unión). Los grupos de unión podrían fijarse directamente a un soporte sólido o se podrían incorporar en una molécula de polímero que, a su vez se puede unir a un soporte sólido. Alternativamente, los grupos de unión se pueden incorporar en un revestimiento reticulado aplicado sobre un soporte sólido con o sin formar un enlace químico entre el revestimiento y el soporte sólido.

Dentro de la técnica se conoce una serie de métodos para fijar grupos de unión a un soporte sólido (véase, por ejemplo, Ulbricht, M., *Advanced Functional Polímero Membranas*, Polímero, 47, 2006, 2217-2262). Estos métodos incluyen, sin limitarse a ellos, modificación directa del soporte sólido con grupos de unión por química de acoplamiento adecuada; adsorción y fijación de moléculas poliméricas. Éste último se puede llevar a cabo por injerto "en" (cuando el polímero se fabrica previamente antes de la reacción con la superficie) e injerto "desde" (cuando la polimerización se inicia utilizando grupos superficiales).

Tal como se describe en el presente documento, la capacidad para controlar la densidad de los grupos de unión en la superficie del soporte sólido es crucial para conseguir con éxito la separación de agregados de proteína y el producto de interés. La densidad de los grupos de unión, expresada en moles/l de medio poroso, o M, puede medirse convenientemente utilizando métodos conocidos entre las personas especializadas en la técnica. Por ejemplo, se puede medir la densidad de los grupos de ácido sulfónico utilizando análisis de intercambio de iones litio. En este análisis, los hidrógenos de los grupos ácido sulfónico se intercambian completamente por iones litio, se aclaran con agua, posteriormente se eliminan por lavado los iones litio en una solución ácida concentrada y se mide la concentración de litio en la solución de lavado ácida por cromatografía de iones.

En la cromatografía de proteína, por lo general ha sido deseable una mayor densidad de ligandos (grupos de unión) ya que por lo general proporciona una mayor capacidad de unión (véase, p.ej., Fogle et al., *J. Chrom. A*, 1225 (2012) 62-69). Normalmente, la densidad de ligandos para la mayoría de las resinas de intercambio catiónico (CEX) disponibles en el mercado es al menos 100 miliequivalentes/L, o mM para un ligando monovalente. Por ejemplo, SP Sepharose Fast Flow y CM Sepharose Fast Flow, distribuidas ambas por GE Healthcare, se incluyen en la lista de la bibliografía de productos por tener la concentración del grupo de intercambio catiónico 180-250 mM y 90-130 mM, respectivamente.

Existe una serie de métodos dentro de la técnica a los que se puede recurrir para controlar la densidad de los grupos de unión sobre un soporte sólido. Cuando se fijan directamente los grupos de unión sobre el soporte sólido, la densidad se puede controlar por la duración de la reacción, el tipo y la concentración de catalizador, la concentración del reactivo, la temperatura y la presión. Cuando se requiere un tratamiento previo de la superficie (activación) del soporte sólido, por ejemplo por oxidación parcial o hidrólisis, el grado de pretratamiento servirá también para controlar la densidad de los grupos de unión que se fijan a la superficie tratada previamente.

Cuando se incorporan los grupos de unión en una estructura polimérica que se adsorbe, adhiere, injerta o reviste sobre un soporte sólido, la densidad de los grupos de unión se puede controlar mediante la composición de la estructura polimérica. Un enfoque para crear la estructura polimérica con una densidad controlada de los grupos de unión es la copolimerización, es decir la polimerización de dos o más tipos de monómeros diferentes en una estructura polimérica única. Un grupo de unión puede ser una parte de uno de los tipos de monómero utilizados para crear la estructura polimérica, al mismo tiempo que se pueden añadir otros monómeros neutros para reducir la densidad de los grupos de unión.

La selección de los monómeros utilizados para crear un polímero que comprende grupos de unión está dictada por la reactividad de los monómeros. La reactividad de los diferentes tipos de monómero y los efectos en la composición de polímero está muy estudiada y documentada (véase, por ejemplo, *Polymer Handbook*, 3ª ed., John Wiley & Sons, 1989, p. II). Los parámetros de los monómeros perfectamente aceptados que predicen la composición del polímero y su estructura son las relaciones de reactividad de los monómeros (véase, por ejemplo, Odian, J., *Principles of Polymerization*, 4ª ed., John Wiley & Sons, 2004, p. 466).

Un método preferente para fijar los grupos de unión en el soporte sólido es una reacción de polimerización *in situ* que incorpora el grupo de unión en un revestimiento reticulado que se aplica sobre el soporte sólido. Dicho método se describe en las patentes estadounidenses Nos. 4.944.879 y 4.618.533, así como la publicación de patente estadounidense publicada No. US2009/208784. Este método es sencillo además de económico. Se puede crear un revestimiento cargado copolimerizando un monómero acrílico cargado, por ejemplo, ácido 2-acrilamido-2-metilpropanesulfónico (AMPS), con un engarce de reticulación adecuado como N,N'-metilen-bisacrilamida (MBAM). La publicación de patente estadounidense No. US2009208784, divulga una membrana microporosa modificada con una mezcla de AMPS y MBAM que se puede utilizar para eliminar los agregados de proteína de alto peso molecular y para mejorar la capacidad del filtro de virus nanoporoso. Sin embargo, las publicaciones de patente que se han

mencionado no explican el control de la densidad del ligando, tal como se describe en el presente documento, para conseguir la eliminación selectiva de agregados de proteína y, sobre todo, agregados de proteína de orden inferior, como dímeros, trímeros, tetrámeros etc.

5 Un monómero neutro que se puede utilizar para reducir la densidad de los ligandos de unión cargados se puede seleccionar dentro de un extenso grupo de monómeros acrílicos, metacrílicos y acrilamida como por ejemplo acrilamida, acrilato de hidroxipropilo, acrilato de hidroxietileno y metacrilato de hidroxietilo. Un monómero preferente es dimetilacrilamida (DMAM). La relación de reactividad entre los monómeros AMPS y DMAM ( $r_1 = 0,162$ ,  $r_2 = 1,108$ ) (véase, *p.ej.*, Polímero Handbook, 3rd ed., John Wiley and Sons, 1989, p. II/156) predice que un polímero que incluye estos monómeros debería tener una tendencia para bloques cortos de poli(DMAM) espaciados por unidades de AMPS individuales, reduciendo así la densidad de los grupos de unión. La selección de la relación entre DMAM y AMPS en la solución de reacción es por tanto un método importante para conseguir una densidad controlada de los grupos de unión.

15 En la Figura 2A se representa estructura química representativa de polímero que contiene grupos de unión, que se reviste sobre un soporte sólido. Para revestir el polímero, por lo general se reticula con otros polímeros. En la Figura 2A, se muestra la estructura polimérica en la que  $R^1$  es cualquier radical orgánico alifático o aromático que contiene un grupo de intercambio catiónico, como *p.ej.*, sulfónico, sulfato, fosfórico, fosfónico o carboxílico;  $R^2$  es cualquier radical orgánico alifático o aromático que no contiene un grupo cargado y  $R^3$  es un engarce orgánico alifático o aromático sin cargar entre dos o más cadenas poliméricas cualquiera.

25 En la estructura polimérica representada en la Figura 2A,  $y > x$ , lo que significa que los grupos neutros (representados por " $R^2$ ") están presentes en un número mayor que los grupos cargados (representados por " $R^1$ "). En este caso, " $x$ ", " $y$ " y " $z$ " son fracciones molares promedio de cada monómero en el polímero y oscilan independientemente entre aproximadamente 0,001 y 0,999. El símbolo  $m$  representa simplemente que está fijada una cadena de polímero similar en el otro extremo del reticulador.

30 En algunas realizaciones, el polímero que contiene grupos de unión es un copolímero de bloque, lo que significa que incluye una cadena larga o bloque de un tipo de monómero (*p.ej.*, que contiene grupos de unión neutros o cargados) seguido de una cadena larga o bloque de un tipo de un monómero diferente (*p.ej.* cargado si el primer bloque es neutro, y neutro si el primer bloque está cargado).

En otras realizaciones, el polímero que contiene grupos de unión contiene los monómeros en un orden aleatorio.

35 En otras realizaciones más, el polímero que contiene grupos de unión es un copolímero alternante, en el que cada monómero siempre está adyacente a dos monómeros de diferente clase en cada lado.

40 En algunas realizaciones, una estructura química representativa de un polímero que contiene grupos de unión es la representada en la Figura 2B, en la que  $R^4$  es NH o O;  $R^5$  es un grupo alifático o aromático lineal o ramificado como  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{C}_2\text{H}_4-$ ,  $-\text{C}_3\text{H}_6-$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{C}_6\text{H}_4-$ ; y  $R^6$  es un grupo sin cargar alifático o aromático lineal o ramificado que contiene un engarce NH, O, o S para la cadena de polímero.

45 En otras realizaciones, una estructura química representativa de un polímero que contiene grupos de unión es la representada en la Figura 2C.  $R^7$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente de un grupo que contiene uno o más radicales orgánicos alifáticos o aromáticos neutros y puede contener heteroátomos como O, N, S, P, F, Cl y otros.

En otras realizaciones más, una estructura representativa de un polímero que contiene grupos de unión está representada por la Figura 2D.

50 Otra estructura química representativa de un polímero que contiene grupos de unión, que está injertado en un soporte sólido está representada en la Figura 2E. El soporte sólido está representado como un rectángulo. En la Figura 2E, se representa una estructura polimérica en la que  $R^1$  es un radical orgánico alifático o aromático que contiene un grupo de intercambio catiónico, como *p.ej.*, sulfónico, sulfato, fosfórico, fosfónico o carboxílico;  $R^2$  es cualquier radical orgánico alifático o aromático que no contiene un grupo cargado. En la estructura polimérica representada en la Figura 2A,  $y > x$ , lo que significa que los grupos neutros (representados por " $R^2$ ") están presentes en un mayor número que los grupos cargados (representados por " $R^1$ ").

60 En algunas realizaciones, el polímero de injerto que contiene grupos de unión es un polímero de bloque, lo que significa que incluye una cadena larga o bloque de un tipo de monómero (*p.ej.*, que contiene grupos de unión neutros o cargados) seguido de una cadena larga o bloque de un tipo de monómero diferente (*p.ej.*, cargado si el primer bloque era neutro y neutro si el primer bloque era cargado).

En otras realizaciones, el polímero que contiene grupos de unión contiene los monómeros en un orden aleatorio.

65 En otras realizaciones, el polímero que contiene grupos de unión es un copolímero alternante, en el que cada monómero está siempre adyacente a dos monómeros de diferente tipo.

En algunas realizaciones, una estructura química representativa de un polímero que contiene grupos de unión está representada en la Figura F, en la que  $R^4$  es NH o O;  $R^5$  es un grupo alifático o aromático lineal o ramificado, como -CH<sub>2</sub>-, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-, -C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-; y  $R_6$  es un grupo sin cargar alifático o aromático lineal o ramificado que contiene un engarce NH, O o S para la cadena de polímero.

5 En otras realizaciones, una estructura química representativa de polímero que contiene grupos de unión está representada en la Figura 2G.  $R^7$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente de un grupo que contiene uno o más radicales orgánicos alifáticos y aromáticos neutros y puede contener heteroátomos como O, N, S, P, F, Cl y otros.

10 En otras realizaciones más, una estructura representativa de polímero que contiene grupos de unión está representada en la Figura 2H.

15 El grupo ácido sulfónico en las Figuras 2B-2D y 2F-2H puede estar en una forma protonada tal como se representante, así como en una forma de sal que contiene un contra-ion adecuado como sodio, potasio, amonio y similares.

#### **IV. Dispositivos que llevan incorporadas las composiciones descritas en el presente documento**

20 En algunas realizaciones, los soportes sólidos que tienen grupos de unión fijados, tal como se ha descrito en el presente documento, se incorporan en dispositivos. Los dispositivos adecuados para los soportes sólidos como, por ejemplo, membranas microporosas, incluyen cartuchos de filtración, cápsulas y vainas. Entre los ejemplos de dispositivos se incluyen también los cartuchos de filtración de placas apiladas descritos en las publicaciones estadounidenses Nos. US20100288690 A1 y US20080257814 A1. En el caso de estos dispositivos, se une permanentemente un soporte sólido a la carcasa polimérica y los dispositivos tienen una entrada para líquido, una salida y una apertura de ventilación y además reducen al mínimo el volumen del líquido retenido. Otros ejemplos de dispositivo incluyen cartuchos de filtro plegados y cartuchos de filtro arrollados en espiral. Otros ejemplos más de dispositivos son columnas de cromatografía. Las columnas de cromatografía se pueden producir a partir de una serie de materiales adecuados, como vidrio, metal, cerámica y plástico. El usuario final puede rellenar estas columnas con el soporte sólido, o también es posible que vengan pre-rellenadas por el fabricante y que se suministren al usuario final ya rellenas.

#### **V. Métodos de uso de las composiciones y los dispositivos descritos en el presente documento**

35 Los dispositivos que contienen soportes sólidos que tienen grupos de unión fijados (p.ej., grupos de unión de intercambio catiónico) se pueden utilizar para eliminar los agregados de proteína en un modo de flujo continuo. Antes de la aplicación para separación a escala preparativa, el proceso debe desarrollarse y validarse en cuanto a unas condiciones de solución apropiadas como el pH y la conductividad, y se debe determinar el intervalo de carga de proteína en el dispositivo. Los métodos para el desarrollo y validación de proceso son muy conocidos y se practican en la industria de forma habitual. Normalmente implican enfoques de Diseño de Experimentos (DoE) que se ilustran en los ejemplos a continuación.

40 Los dispositivos se suelen lavar por descarga, desinfectar y equilibrar con una solución de tampón apropiada antes de su uso. Se ajusta la solución de proteína a una conductividad y un pH deseables y después se bombea a través de un dispositivo a una presión constante o a un flujo constante. Se recoge el efluente y se analiza para determinar el rendimiento de proteína y la concentración de agregado.

45 En algunas realizaciones, un dispositivo para eliminar el agregado, tal como se describe en el presente documento, está conectado directamente a un dispositivo de filtración de virus que está diseñado para asegurar la eliminación de partículas virales sobre la base de su tamaño, por ejemplo, tal como se instruye en la patente estadounidense No. 7.118.675.

50 La etapa de eliminación de agregado por flujo continuo utilizando las composiciones y dispositivos descritos en el presente documento se puede incorporar en cualquier momento del proceso de purificación de proteínas, p.ej., en un proceso de purificación de anticuerpo. En la Tabla 1 se describen ejemplos de procesos de purificación de proteína que incorpora la eliminación del agregado de flujo continuo como una o más de las etapas intermedias, que se resalta en negrita. Debe entenderse que son posibles muchas variaciones de estos procesos.

55 La etapa de "captura de proteína" tal como se describe en el presente documento, se refiere a la etapa de un proceso de purificación de proteína que implica el aislamiento de la proteína de interés de una muestra líquida de cultivo celular aclarado o sin aclarar realizando al menos dos de las siguientes etapas: i) someter el líquido de cultivo celular a una etapa seleccionada entre una o más entre: adsorción de la proteína de interés sobre una resina de cromatografía, una membrana, un monolito, un medio tejido o no tejido, precipitación, floculación, cristalización, unión a una molécula pequeña soluble o un ligando polimérico, obteniendo así una fase de proteína que comprende la proteína de interés, como pueda ser un anticuerpo; y (ii) reconstituir la proteína de interés eluyendo o disolviendo la proteína en una solución de tampón adecuada.

60

65

La purificación por unión/elución es una etapa de proceso opcional que consiste en la unión de la proteína de interés a un medio de cromatografía adecuado, opcionalmente, el lavado de la proteína de unión y su elución con una solución de tampón apropiada.

5 El pulido por AEX de flujo continuo es una etapa de proceso opcional que consiste en el flujo de la solución de proteína de interés a través de un medio de cromatografía AEX adecuado sin unión significativa de la proteína de interés al medio.

10 El flujo continuo de carbón activado es una etapa de purificación opcional diseñada para eliminar las distintas impurezas relacionadas con el proceso, tal como se describe en la solicitud de patente provisional co-pendiente no. 61/575.349.

15 La filtración de virus consiste en el flujo de la solución de proteína a través de una membrana porosa que puede presentarse en forma de lámina plana o fibra hueca que retiene las partículas virales en un alto grado de LRV, al mismo tiempo que pasa sustancialmente toda la proteína de interés.

Tabla 1

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4	Etapa 5
Proceso A	Captura de anticuerpo	Purificación unión/elución	Pulido AEX de flujo continuo	Eliminación de agregado por flujo continuo	Filtración de virus
Proceso B	Captura de anticuerpo	Eliminación de agregado por flujo continuo	Purificación unión/elución	Pulido AEX de flujo continuo	Filtración de virus
Proceso C	Captura de anticuerpo	Purificación unión/elución	Eliminación de agregado por flujo continuo	Pulido AEX de flujo continuo	Filtración de virus
Proceso D	Eliminación de agregado por flujo continuo	Captura de anticuerpo	Purificación unión/elución	Pulido AEX de flujo continuo	Filtración de virus
Proceso E	Captura de anticuerpo	Eliminación de agregado por flujo continuo	Pulido AEX de flujo continuo	Filtración de virus	
Proceso F	Captura de anticuerpo	Eliminación de agregado por flujo continuo	Pulido AEX de flujo continuo	Purificación unión/elución	Filtración de virus
Proceso G	Captura de anticuerpo	Pulido AEX de flujo continuo	Eliminación de agregado por flujo continuo	Purificación unión/elución	Filtración de virus
Proceso H	Captura de anticuerpo	Pulido AEX de flujo continuo	Eliminación de agregado por flujo continuo	Filtración de virus	
Proceso I	Captura de anticuerpo	Flujo continuo de carbón activado	Pulido AEX de flujo continuo	Eliminación de agregado por flujo continuo	Filtración de virus

20 Debe entenderse que en la Tabla 1 anterior, la etapa de captura de anticuerpo, así como la purificación de unión/elución se pueden llevar a cabo en cualquiera de los tres modos: (1) modo discontinuo, en el que se carga el medio de captura con la proteína diana, se detiene la carga, se lava y se eluye el medio y se recoge la reserva; (2) modo semi-continuo, en el que se lleva a cabo la carga de forma continua y la elución es intermitente, p.ej., en el caso de un procedimiento de cromatografía multi-columna continuo empleando dos, tres o más columnas; y (3) modo completamente continuo, en el que la carga y la elución se llevan a cabo de forma continua.

25 El caudal óptimo utilizado con el soporte sólido de intercambio catiónico de flujo continuo descrito en el presente documento puede tener a veces un efecto sobre el comportamiento de eliminación del agregado del soporte sólido y, cuando se ubica el soporte sólido corriente arriba de un filtro de virus, puede afectar también al comportamiento del filtro de virus. El caudal óptimo puede determinarse fácilmente en un sencillo conjunto de experimentos utilizando la solución de proteína de interés. Los caudales típicos entran dentro del intervalo comprendido entre  
30 aproximadamente 0,05 y 10 CV/min.

35 Algunos ejemplos de los procesos descritos en la Tabla 1, en particular el Proceso E, Proceso H y Proceso I, no incluyen una etapa de cromatografía de intercambio catiónico de unión y elución, pero siguen asegurando la eliminación de agregado utilizando los métodos descritos en el presente documento. La eliminación de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico de unión y elución ofrece una serie de significativas ventajas para el proceso de purificación corriente abajo, es decir, se ahorra tiempo de proceso, se simplifica el desarrollo del proceso, se

elimina la limpieza y la validación de la limpieza, etc. Otra sólida ventaja es la eliminación de elución de alta conductividad, que da cabida a la realización de todo el proceso corriente abajo sin la adición de sal y sin posteriores diluciones.

- 5 La presente invención se ilustra además con los siguientes ejemplos que no deberán interpretarse como exhaustivos.

### Ejemplos

#### 10 **Ejemplo 1. Preparación de membrana modificada superficialmente de intercambio catiónico (CEX)**

En este experimento, se prepararon membranas modificadas superficialmente CEX con una densidad variable de grupos de unión, que en este caso son radicales de ácido sulfónico con carga negativa. La densidad de los grupos de intercambio catiónico fue controlada según la formulación de la solución reactiva utilizada para modificación superficial. Para conseguir una densidad inferior, se añadió un monómero reactivo sin carga, N,N-dimetilacrilamida, en diferentes cantidades.

Se preparó una serie de soluciones acuosas con un contenido de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanesulfónico (AMPS) comprendido entre 0 y 4,8 % en peso, de N,N-dimetilacrilamida comprendido entre 0 y 4,8 % en peso y 0,8 % en peso de N,N'-metilbisacrilamida. Se cortó una membrana de polietileno de peso molecular ultra-alto hidrófila con un tamaño de poro valorado en 0,65  $\mu\text{m}$  y un grosor de 0,125 mm en piezas cuadradas de 14 cm por 14 cm y se sumergió cada una de las piezas en una de las soluciones durante 30 segundos para asegurar que se humedecían completamente. Se escurrió el exceso de solución y se expuso la membrana a 2 MRads de radiación de haz de electrones bajo una atmósfera inerte. A continuación, se aclaró la membrana con agua desionizada y se secó al aire.

En la Tabla 2 se enumeran las variantes de membranas modificadas superficialmente CEX que se prepararon. Se determinó utilizando intercambio de ion litio que la densidad de grupo aniónico era 0,13 mmoles/g para la Membrana 8 (sin añadir DMAM) y 0,08 mmol/g para la Membrana 7 (1:1 AMPS: DMAM en peso), que corresponde a densidades de ligando de 34 y 21 mM, respectivamente.

#### 30 **Ejemplo 2. Análisis de selectividad de unión de agregado utilizando mediciones de la capacidad estática**

En este experimento, se sometieron a ensayo membranas CEX con diferentes densidades de grupos de unión preparadas en el Ejemplo 1, en cuanto a su selectividad para la unión de monómeros de proteína y agregados de proteína.

Se preparó una solución de 2 g/l de un anticuerpo monoclonal parcialmente purificado, al que se hace referencia como MAb I, con un contenido de aproximadamente 15 % de agregados en 50 mM de tampón de acetato sódico, pH 5,0. Se empapó previamente un disco de membrana de 14 mm en el tampón de acetato y después se transfirió a 0,5 ml de solución de anticuerpo. Se agitaron suavemente los viales de solución durante 15 horas y se analizaron las especies de peso molecular que quedaron en la solución por cromatografía por exclusión de tamaño. En la Tabla 2 se muestran los resultados.

Si bien los rendimientos generalmente bajos de MAb indican que se han cargado las membranas a una baja capacidad en este experimento, una de las variantes, Membrana 7, demostró una eliminación prácticamente completa de los dímeros y agregados de alto peso molecular (HMW). Esto indica que es posible conseguir una sólida selectividad de unión de agregados.

Tabla 2

Membrana Muestra No.	AMPS % p (grupo de unión CEX)	DMAM % p (grupo neutro)	monómero MAb que queda en rendimiento de solución (%)	Dímero MAb que queda en el rendimiento de solución (%)	Agregado HMW MAb que queda en rendimiento de solución (%)
1	0	4,8	82,5	86,1	80,4
2	0,1	4,7	80,8	69,2	81,8
3	0,2	4,6	86,6	75,4	94,5
4	0,4	4,4	88,4	77,9	106,5
5	0,6	4,2	78,0	63,5	53,7
6	1	3,8	70,3	32,3	n/d
7	2,4	2,4	29,4	1,6	n/d

8 (membrana técnica anterior descrita en WO 2010098867)	4,8	0	44,4	14,7	n/d
9	Control de membrana sin modificar		80,4	69,0	74,7
n/d – no detectado					

### **Ejemplo 3. Eliminación de agregados en modo de flujo continuo para un anticuerpo monoclonal parcialmente purificado (MAB I)**

5 En un experimento representativo, se demostró el éxito del uso de membranas de acuerdo con la presente invención para la eliminación de agregados de proteína de una muestra con un contenido de anticuerpo monoclonal en modo de flujo continuo.

10 Se sellaron cinco capas de la Membrana 7 del Ejemplo 1 en un dispositivo de polipropileno ventilado, con un área de filtración de membrana frontal de 3,1 cm<sup>2</sup> y un volumen de membrana de 0,2 ml. En adelante, se hace referencia a este tipo de dispositivo como dispositivo "Micro". Se dializó MAB I purificado a 4,5 g/l en 50 mM de tampón acetato, pH 5,0. Se diluyó el material resultante, denominado MAB I parcialmente purificado, a una concentración de 1 g/l de MAB I con 5 % de agregados, en 50 mM de acetato, pH 5, con una conductividad de ~3,0 mS/cm. A continuación, se pasó el material (aproximadamente 80-100 ml) a través de dispositivos de 0,2 ml que contenían o bien la membrana 7 o bien la membrana 8 del ejemplo 1, o un dispositivo Acrodisk de 0,18 ml que contenía una membrana Pall Mustang® S (disponible en el mercado por Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) a ~ 1 CV/min. Antes de pasar el MAB, se humedecieron los dispositivos de membrana con agua 18 mΩ y se equilibraron con 50 volúmenes de columna (CV) de 50 mM de acetato sódico, pH 5,0. Se recogió el flujo continuo de la solución MAB para su análisis utilizando cromatografía por exclusión de tamaño analítica (SEC). En las figuras 3A-3C se muestran los resultados. Es evidente que la Membrana 7, con una densidad menor de grupos de unión AMPS en comparación con la Membrana 8, según se estableció en el Ejemplo 1, ofrece una selectividad superior de unión de agregados.

25 En la Tabla 3 se resume la capacidad de unión de agregados de las tres membranas medidas a aproximadamente 20 % de paso sin retención de agregados. Tal como se demuestra, la Membrana 7 presenta un aumento tres veces mayor de la capacidad de unión de agregado en comparación con las membranas disponibles en el mercado, p.ej., la membrana Pall Mustang® S, así como la Membrana 8.

Tabla 3. Carga de dispositivo y capacidad de paso sin retención de dímero en torno a 20 %

Membrana	A % paso de dímero	Carga de membrana (g/l)	Capacidad de dímero (mg/ml)	Rendimiento de monómero (%)
7	16,2	300	10,7	89,2
8	23,1	120	3,9	77,1
PALL Mustang S	28,6	120	3,7	71,0

### **Ejemplo 4. Eliminación de agregados en modo de flujo continuo para anticuerpo monoclonal parcialmente purificado (MAB II)**

35 En otro experimento, se demuestra el éxito del uso de las membranas de acuerdo con la presente invención para eliminar los agregados de proteína de una muestra que contiene un anticuerpo monoclonal diferente.

40 Se ajustó MAB II purificado de Proteína A a un pH 5,0 utilizando 1 M Tris base y a una conductividad de 3,4 mS/cm utilizando solución de NaCl 5 M. El material resultante denominado MAB II parcialmente purificado tenía una concentración de 6 g/l con 2,4 % de agregados. A continuación, se pasó el material (aproximadamente 18 ml) a través de dispositivos de 0,2 ml que contenían o bien la membrana 7 o bien la membrana 8 del Ejemplo 1. Antes de pasar MAB a través de la membrana, se humedeció la membrana con agua 18 mΩ y se equilibró con 50 volúmenes de columna (CV) de 50 mM de acetato sódico, pH 5,0. Se recogió el flujo continuo de la solución MAB para su análisis por cromatografía por exclusión de tamaño (SEC). Las 2 primeras fracciones fueron de ~4,5 ml cada una, mientras que el resto de las 10 fracciones fueron de 0,85 ml cada una. Después del tratamiento de MAB, se lavó la membrana con 20 CV de 50 mM de acetato sódico, pH 5,0. Se eluyó la proteína unida utilizando de acetato sódico 50 mM, pH 5,0 + 1 M NaCl en 30 CV. La cantidad total de MAB II cargada en las membranas fue 531 mg/ml. Se calculó el rendimiento de monómero MAB sobre la base de la cantidad de monómero en el flujo continuo frente al total de monómero que pasó a través de la membrana.

Tal como se muestra en la Figura 4A, se observó muy poco agregado (<0,1 % en la reserva) en la reserva de paso sin retención de la Membrana 7, hasta ~ 13 g/l de carga de agregado, en cambio se observó el paso sin retención de agregado para la Membrana 8 incluso en la primera fracción recogida, lo que indica una capacidad del agregado superior para la membrana 7. La cantidad de agregados en la reserva del paso sin retención para la Membrana 8 fue 0,8 %. A una carga de agregado de 13 g/l, los rendimientos de monómero fueron 93 y 86 para la Membrana 8 y la Membrana 7, respectivamente. Aunque el rendimiento fue ligeramente más bajo, no se observó el paso sin retención de agregado para la Membrana 7. Un paso sin retención posterior de los agregados es indicativo de una mayor capacidad de unión del agregado. Estas curvas de paso sin retención se pueden utilizar para guiar el diseño de un proceso o dispositivo de eliminación de agregado a escala preparativa. Por ejemplo, un dispositivo que contiene la Membrana 7 puede cargarse a al menos 500 g/l para conseguir una pureza de la reserva de <0,1 % de agregados. Por lo general, es muy deseable una carga superior para aumentar el rendimiento de monómero y reducir el coste global asociado con el proceso. Por otra parte, se puede conseguir un mayor rendimiento aumentando la carga hasta que se observa el paso sin retención del agregado o modificando las condiciones de solución. Los datos de flujo continuo demuestran claramente el comportamiento superior de la Membrana 7 para la eliminación de agregados.

La figura 4B presenta el rendimiento de monómero y los niveles de agregado en las reservas del paso sin retención para dos ciclos diferentes utilizando dos lotes diferentes de Membrana 7. El ciclo 2 se cargó con 700 mg/ml en comparación con el ciclo 1 a 530 mg/ml. Las condiciones de solución (pH y conductividad) fueron similares en ambos ciclos, mientras que las concentraciones MAb fueron diferentes (ciclo 1: 6 g/l; ciclo 2: 4,4 g/l). La cantidad de agregados en la reserva fue similar en ambos ciclos, pero hubo algunas diferencias en el rendimiento (sin embargo, se anticipa que las diferencias en los rendimientos se podrían atribuir a una variabilidad general de las técnicas de análisis utilizadas para medir las concentraciones de MAb). Como dato curioso, incluso a una carga de MAb de 700 g/ml, la cantidad de agregados en la reserva es solamente 0,25% (ciclo 2; Figura 4B) lo que indica una capacidad de unión para los agregados de > 15 g/l.

#### **Ejemplo 5. Eliminación de agregados en modo de flujo continuo para un anticuerpo monoclonal parcialmente purificado (MAb III) que contiene agregados inducidos de pH alto**

En otro experimento, se demostró el éxito del uso de membranas de acuerdo con la presente invención para la eliminación de agregados de proteína de una muestra que contiene otro anticuerpo monoclonal más, MAb III.

Se preparó una solución de material de alimentación de IgG monoclonal parcialmente purificado (MAb III) a 6 g/l en 50 mM de tampón acetato, pH 5, con una conductividad de 3,5 mS/cm. Previamente, se impactó el MAb III a un pH alto (11) con el fin de generar 3,7 % de agregados en total (se midió por SEC-HPLC). Se pre-moldeó un dispositivo de filtración Micro con un área de filtración de 3,1 cm<sup>2</sup> y un volumen de 0,2 ml utilizando 5 capas de Membrana 7. Antes de pasar el MAB, se humedeció la membrana con agua 18 mΩ y se equilibró con 50 volúmenes de columna (CV) de 50 mM de acetato sódico, pH 5,0. El flujo continuo de la solución de MAb fue a 2,5 CV/min y se recogieron las fracciones para su análisis por cromatografía por exclusión de tamaño analítica (SEC). La cantidad total de MAb III que se cargó en las membranas fue 930 mg/ml. Se calculó el rendimiento del monómero sobre la base de la cantidad de monómero en el flujo continuo frente al total de monómero que pasó a través de la membrana.

De manera similar a los Ejemplos 3 y 4 para MAb I y II, la Membrana 7 presentó una alta selectividad y una alta capacidad de unión (>10 mg/ml) para agregados de MAb III, tal como se muestra en la Figura 5.

#### **Ejemplo 6: Purificación de monómeros de proteína y agregados de proteína**

En este experimento, se generaron preparaciones de monómeros de anticuerpo y agregados puros utilizando SEC preparativa para la posterior caracterización de la Membrana 7.

Se purificaron monómeros y agregados de una mezcla utilizando la resina Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare). Se pasaron 4,5 ml de MAb parcialmente purificada a 4,5 - 6 g/l a través de una columna de 330 ml. Antes de la inyección de MAb, se equilibró la columna con 1 volumen de columna (CV) de PBS. Se recogieron dos fracciones de elución: fracciones de agregado y de monómero. Se concentró la fracción de agregado 10 X utilizando una membrana Amicon UF de límite 3000 MW y se analizó utilizando SEC analítica. El contenido de agregado fue >70 % en estas fracciones con una concentración de ~0,5 g/l.

#### **Ejemplo 7: Determinación de parámetros de modelo de la acción de masa estérica (SMA): carga característica (v) y constante de equilibrio SMA (K<sub>SMA</sub>)**

Se diseñó el siguiente experimento para elucidar el mecanismo de la selectividad de unión de agregado observada para las membranas de acuerdo con la presente invención. Utilizando el modelo de Acción de Masa Estérica (SMA) (véase p.ej., Brooks, C. A. and Cramer, S. M., Steric mass-action ion exchange: Displacement profiles and induced salt gradients. *A/ChE Journal*, 38: pp. 1969-1978, 1992), se midió el número de interacciones de agregado con la superficie (v) y la constante de afinidad (K<sub>SMA</sub>) para el monómero y los agregados, para reflejar la afinidad de los monómeros y los agregados con la superficie.

5 El modelo SMA se ha utilizado con éxito para explicar algunas complejidades de interacciones de intercambio aniónico no lineales. El modelo tiene en cuenta los sitios que no están disponibles para las moléculas de proteína considerando tanto los sitios "perdidos" (p.ej., que no están disponibles para unión) como consecuencia de la interacción directa proteína-ligando como los sitios estéricamente "perdidos" como consecuencia del impedimento de la proteína. Se da por supuesto que la cantidad de sitios "perdidos" como consecuencia del impedimento estérico es proporcional a la concentración de proteína unida. La ecuación SMA para un sistema de un solo componente viene dada por:

$$C = \frac{Q}{K_{SMA}} \left( \frac{C_{sal}}{Q_{sal}} \right)^v = \frac{Q}{K_{SMA}} \left( \frac{C_{sal}}{\Lambda - (\sigma + v)Q} \right)^v$$

(1)

10 en la que Q y C son respectivamente concentraciones de proteína unida y libre. K es la constante de asociación en equilibrio de SMA; v es la carga característica; σ es el factor estérico; C<sub>sal</sub> es la concentración de sal libre; Q<sub>sal</sub> es la concentración de sal unida disponible para intercambio iónico; y Λ es la capacidad iónica total de la resina. La carga característica es el promedio del número de sitios en el soporte sólido modificado ocupados por una proteína a través de interacciones iónicas y el factor estérico es el número de sitios estéricamente impedidos por una proteína tras la unión con el adsorbente.

15 Para la región lineal de la isoterma de adsorción (cuando Q es muy pequeña  $\Lambda \gg (\sigma + v)Q$  y es posible aproximar la ecuación anterior a:

$$\frac{Q}{C} = K_p = K_{SMA} \left( \frac{\Lambda}{C_{sal}} \right)^v$$

(2)

20 El término Q/C se define como el coeficiente de partición (K<sub>p</sub>) y la relación de coeficientes de partición se define como selectividad (S). Un método alternativo para determinar el coeficiente de partición es calculando la pendiente de la isoterma de adsorción en la región lineal (p.ej., tal como se describe en la patente EE.UU. No. 8.067.182).

25 En un experimento, se humedecieron dispositivos Micro de membrana de 0,2 ml (que contiene tanto Membrana 7 como 8) utilizado agua y se equilibraron con 20 CV (4 ml) de 50 mM de acetato sódico, pH 5,0 (tampón A). Se inyectaron 100 µl de monómero o agregado purificado (en cuanto al proceso de purificación descrito en el Ejemplo) a 0,5 g/l. Se eluyó la proteína unida utilizando 20 CV de gradiente de tampón A y tampón A + 500 mM NaCl. Se seleccionó la concentración de sal para los ciclos isocráticos sobre la base del intervalo de concentración de sal (conductividad) en el que eluye la proteína. Se realizó el ciclo isocrático cargando 100 µl de proteína en la membrana. El tampón de corrida fue tampón A + sal (se utilizaron diferentes concentraciones de sal sobre la base del intervalo de elución de proteína, tal como se ha descrito anteriormente). Se llevó un seguimiento del cromatograma de elución utilizando señal UV280 o UV230 y se señaló el volumen de retención en el máximo de proteína. Se determinaron los parámetros SMA utilizando el método de elución isocrático tal como lo describe Pedersen, et al, (Pedersen, et. al., Whey proteins as a model system for chromatographic separation of proteins, J. Chromatogr. B, 790: pp.161-173, 2003).

40 En la Tabla 4 se resumen los parámetros de SMA para MAb I para las Membranas 8 y 7. La Tabla 4 resume los parámetros SMA para MAb II para las Membranas 8 y 7. Se determinó K<sub>SMA</sub> dando por supuesta una capacidad iónica de 34 y 21 mM para las membranas 8 y 7, respectivamente. Se utilizó una porosidad de membrana de 78 %.

Tabla 4. Parámetros SMA para MAb I

MAb I	Especie	V	K <sub>SMA</sub>
Membrana 8	Monómero	13,2	1,04E13
	Agregados	13,55	1,00E13
Membrana 7	Monómero	9,66	4,21E10
	Agregados	14,0	2,32E14

Tabla 5, Parámetros SMA para MAb II

MAb II	Especie	V	K <sub>SMA</sub>
Membrana 8	Monómero	9,8	2,79E9
	Agregados	11,2	4,44E10
Membrana 7	Monómero	13,4	2,11E12
	Agregados	23,4	9,06E21

5 Para ambos MAb, se observó que la diferencia en la carga característica del monómero y los agregados es superior para la Membrana 7, lo que indica un mayor número de interacciones para los agregados que para los monómeros. Por otra parte, la afinidad (tal como se observa por K<sub>SMA</sub>) es superior para la Membrana 7 que para la Membrana 8.

10 Tal como queda representado en las Figuras 6A y 6B, se observó que el coeficiente de partición (una medida de la afinidad) para agregados es superior que la observada para monómeros en el caso de ambas Membranas 8 y 7, indicando así una unión más fuerte a los agregados que a los monómeros. También se observó que el efecto es más pronunciado en el caso de la Membrana 7 en relación con la Membrana 8, lo que demuestra un comportamiento superior de los primeros para la eliminación de agregados.

15 Tal como se representa en la Figura 7, la Membrana 7 tiene una selectividad superior (S = relación entre el K<sub>p</sub> del agregado y el K<sub>p</sub> del monómero) que la membrana 8 para dos MAb diferentes (MAb I y MAB II) a pH 5,0 a todas las concentraciones de sal. Cabe destacar que la selectividad aumenta a medida que disminuye la concentración de sal para ambas membranas. Y, curiosamente el aumento de la selectividad es mucho mayor para la Membrana 7 que la Membrana 8, lo que indica que una selectividad superior podría tener lugar incluso a una menor densidad de los grupos de unión. Asimismo, tal como se representa en la Figura 7, los máximos beneficios de comportamiento (un mayor rendimiento de monómero y una mayor eliminación de agregado) se obtuvieron incluso a concentraciones de sal menores (o una selectividad superior).

#### **Ejemplo 8: Determinación de ventana operativa para la Membrana 7**

25 En un experimento representativo, se demostró, utilizando un enfoque de Diseño de Experimentos (DoE), que se puede conseguir una ventana de proceso práctica, es decir, combinación de pH de solución, conductividad iónica y carga de proteína sobre las membranas de acuerdo con la presente invención. El enfoque de Diseño de Experimentos (DoE) es una herramienta de ingeniería comúnmente aceptada para identificar de forma fiable las condiciones operativas (véase, por ejemplo, Anderson, M.J. and Whitcomb, P.J. 2010 Design of Experiments. Kirk-Othmer Encyclopedic of Chemical Technology. 1-22).

30 Se llevó a cabo un enfoque DoE de respuesta superficial de material compuesto central aplicando con 3 factores en modo discontinuo para la Membrana 7 con el fin de determinar su ventana operativa. Los parámetros que se investigaron fueron: pH, conductividad y carga de agregado. Se incubaron diversas cantidades de MAb I parcialmente purificado (0,5 - 2,1 ml) en distintas condiciones (Tabla 5) con 13 µl de membrana durante 20 horas. A continuación, se analizó el sobrenadante en cuanto a los agregados y el rendimiento utilizando SEC analítica.

Tabla 6. Ciclos y resultados de un enfoque de Diseño de experimentos de respuesta superficial de material compuesto central de 3 factores

Etiqueta	pH	Cond (mS/cm)	Carga de agregado (g/l)	% monómero	% rendimiento
1	4	3	5	100	78,4
2	6	3	5	100	85,9
3	4	10	5	100	77,7
4	6	10	5	95,6	100
5	4	3	15	98,1	92,8

40 Este estudio de DoE resaltó tres parámetros operativos clave – carga, pH y conductividad, en la determinación del comportamiento de la membrana para el rendimiento y la eliminación de agregados e indican un procedimiento simple para definir la ventana operativa deseada. En las Figuras 8 y 9 se traza el gráfico de los resultados.

#### **Ejemplo 9. Uso de membranas de acuerdo con la presente invención en la protección de filtración de virus corriente abajo durante la purificación de anticuerpos utilizando una corriente de alimentación que contiene agregados inducidos por calor**

50 En este ejemplo se demuestra que se pueden emplear con éxito las membranas que comprenden uno o más grupos de intercambio catiónico descritos en el presente documento para aumentar la tasa de transferencia de un filtro de virus corriente abajo en un proceso de purificación.

En general, se ha notificado anteriormente que es posible utilizar una membrana modificada superficialmente para tratar previamente el material de alimentación de anticuerpo antes de la filtración de virus (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 7.118.675 y PCT la publicación no. WO 2010098867). Dado el alto coste de la filtración de virus, aumentar la tasa de transferencia del filtro tiene un efecto directo sobre el coste final del producto de proteína.

Actualmente, se distribuyen en el mercado una serie de productos comerciales específicamente para aumentar la tasa de transferencia de los filtros de virus, incluyendo los distribuidos por EMD Millipore Corporation, *p.ej.*, Viresolve® Prefilter y Viresolve® Pro Shield. Sin embargo, tal como se ha demostrado en el presente documento, las membranas de acuerdo con la presente invención son bastante superiores en la protección de filtros de virus corriente abajo en comparación con los descritos en la técnica anterior o los que existen hoy en día en el mercado.

Se preparó una corriente de alimentación de IgG policlonal de choque térmico para determinar la protección de un filtro de virus a 0,1 g/l, utilizando la IgG de SeraCare Life Sciences (Milford, MA), Solución de Gamma Globulina Humana al 5 %, Catálogo no. HS-475-1L, en 50 mM de acetato, un pH 5, a 8,1 o 16,0 mS/cm (utilizando NaCl) a través del siguiente procedimiento. Se agitó un litro de una solución 0,1 g/l (a 8,1 o 16,0 mS/cm) a 170 rpm al mismo tiempo que se calentada en un baño de agua constante establecido en 65 ° Celsius durante 1 hora después de alcanzar la temperatura. Se retiró la solución del calor y la agitación y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 3 horas y después se refrigeró a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente se dejó templar la IgG policlonal de choque térmico a la temperatura ambiente. Se prepararon soluciones frescas de 0,1 g/l de IgG policlonal en tampones filtrados para esterilización, pH y conductividad apropiados (8,1 o 16,0 mS/cm).

Se prepararon soluciones finales para realizar un ensayo completo utilizando 9 % en volumen de soluciones de reserva de IgG policlonal de choque térmico y las soluciones de IgG policlonales 0,1 g/l recién preparadas. Se realizaron los ajustes del pH y la conductividad finales utilizando 10 M HCl, NaOH o 4 M NaCl. Se pre-moldearon dispositivos de filtración Micro con un área de filtración de 3,1 cm<sup>2</sup> utilizando 3 capas de membrana y se colocaron en serie en una relación de área 1:1 con dispositivos Viresolve® Pro (EMD Millipore Corp., Billerica, MA). Se humedecieron previamente ambos dispositivos y se ventilaron para eliminar el aire utilizando el tampón solamente, pH 5, 5 mM de acetato, 8,1 o 16,0 mS/cm. A una presión constante de 30 psi (207 kPa), se midió un flujo inicial en ml de tasa de transferencia de tampón/min por masa durante un período de 15 minutos para determinar el valor de flujo constante inicial. Se cambió el material de alimentación por material de alimentación de IgG policlonal de choque térmico a 30 psi (207 kPa) y se midió la tasa de transferencia en volumen y se trazó un gráfico con respecto al tiempo hasta que decayó el flujo a un 25 % del flujo del tampón inicial solamente. Se midió la tasa de transferencia total de IgG policlonal de choque térmico en l/m<sup>2</sup> a V75 y se convirtió a kg de membrana IgG/m<sup>2</sup> policlonal. Tal como se puede observar en la Tabla 6, la Membrana 7 proporcionó una protección superior de un filtro de eliminación de virus (mayor transferencia volumétrica) que la Membrana 8.

Tabla 7

	Tasa de transferencia de V75 (l/m <sup>2</sup> )	
	8,1 mS/cm	16 mS/cm
Viresolve® Pro solamente	46,5	26
Dispositivo Membrana 8 + Viresolve® Pro (Prior Art)	487	1,406
Dispositivo Membrana 7 + Viresolve® Pro	1,567	>2,390

**Ejemplo 10. Uso de membranas de acuerdo con la presente invención en la protección de filtro de virus corriente abajo utilizando un material de alimentación de anticuerpo monoclonal**

Se preparó una solución de material de alimentación de IgG monoclonal parcialmente purificado (MAb III) para 6 g/l en tampón acetato 50 mM, pH 5, con una conductividad de 8,5 mS/cm (con adición de NaCl). El MAb III había sido sometido a choque previamente a un pH superior (11) para generar aproximadamente 4 % de agregados en total (según se mide por SEC-HPLC). Se moldearon previamente los dispositivos de filtración Micro con un área de filtración de 3,1 cm<sup>2</sup> utilizando 3 capas de membrana y se colocaron en serie en una relación de área 1:1 con dispositivos Viresolve® Pro (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA). Se humedecieron y se ventilaron previamente ambos dispositivos para eliminar el aire utilizando solamente el tampón filtrado estéril 50 mM de acetato, pH 5, 8,5 mS/cm. Se acondicionó previamente también la membrana de virus durante 10 minutos a un caudal constante que generó una contrapresión constante de 30 psi (207 kPa). A continuación, se introdujo la solución de MAb III a un flujo constante de 200 l/(m<sup>2</sup>-h) a través de los dispositivos en serie y se midió la contra presión con respecto a tiempo. Se determinó la tasa de transferencia de volumen total a un criterio de valoración en el que la contrapresión alcanzó 30 psi. Se convirtió la tasa de transferencia l/m<sup>2</sup> a un límite de 30 psi (207 kPa) en kg de MAb por m<sup>2</sup> de membrana.

Tal como se puede apreciar en la Tabla 8, a continuación, la Membrana 7 proporcionó una protección superior para un filtro de eliminación de virus (una mayor transferencia volumétrica) que la membrana 8.

Tabla 8

Transferencia a 30 psi (kg/m <sup>2</sup> )	
Viresolve® Pro solamente	0,06
Dispositivo Membrana 8 + Viresolve® Pro	0,33
Dispositivo Membrana 7 + Viresolve® Pro	0,66

#### **Ejemplo 11. Efecto de tiempo de residencia en el comportamiento del filtro de virus**

- 5 En este experimento representativo, se investigó el efecto del tiempo de residencia en el comportamiento de una filtración de virus, en el que se colocó el filtro de virus corriente debajo de la Membrana 7 en un proceso de purificación de flujo continuo. Se observa que un menor caudal a través del dispositivo que contiene la Membrana 7 y la etapa de filtración de virus tiene como resultado una mayor tasa de transferencia del filtro de virus.
- 10 Se conecta un dispositivo de tres capas que contiene la Membrana 7, que tiene un área de membrana de 3,1 cm<sup>2</sup> y un volumen de membrana de 0,12 ml, en serie con un dispositivo de filtración de virus, que tiene un área de membrana de 3,1 cm<sup>2</sup>. Se procesa aproximadamente 3 mg/ml de una IgG humana policlonal (Seracare) en 20 mM de tampón acetato sódico, pH 5,0, a través de dos dispositivos conectados. Se lleva a cabo el experimento a dos caudales por separado, 109 y 200 LMH. Se coloca un filtro estéril de 0,22 µm entre el dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico y el dispositivo de filtración de virus.

15 Se utiliza un sensor de presión para medir la presión a través del conjunto a diferentes caudales. Normalmente, una presión de aproximadamente 50 psi (344 kPa) es una indicación del atasco o ensuciamiento de la membrana de filtración de virus. Tal como se muestra en la Figura 10, cuando se realiza el experimento a un caudal más bajo (es decir 100 LMH), se puede procesar más volumen de muestra a través de la membrana de filtración de virus (es decir, mayor tasa de transferencia) en relación con el caso en el que se procesa la muestra a un caudal mayor (es decir 200 LMH). Esto se podría atribuir a un tiempo de residencia mayor de la muestra en el dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico que puede tener como resultado una mejor unión de agregados de IgG de peso molecular alto, evitando así el atasco prematuro del filtro de virus.

#### **Ejemplo 12. Conexión de varias etapas de eliminación de impurezas en flujo continuo en una etapa**

25 En este experimento representativo, se demuestra la viabilidad de conectar varias etapas de eliminación de impurezas en una única operación, al mismo tiempo que se satisfacen los objetivos de pureza y rendimiento. Esto se realiza conectando los dispositivos individuales, en concreto carbón activado, un dispositivo de intercambio aniónico (p.ej., ChromaSorb™), una mezcladora estática en línea y/o un tanque de compensación para cambio de pH, un dispositivo de flujo continuo de intercambio catiónico para la eliminación de agregados, tal como se describe en el presente documento y un dispositivo de eliminación de virus (p.ej. Viresolve® Pro).

30 A continuación, se describen el ajuste, equilibrio y procedimiento.

35 El tren de purificación de flujo continuo consiste en cinco operaciones unitarias principales. carbón activado (con un filtro de profundidad opcional al frente), un dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico (p.ej., ChromaSorb), una mezcladora estática en línea y/o un tanque de compensación para el ajuste del pH en línea, un dispositivo de flujo continuo de intercambio catiónico para la eliminación de agregado y un dispositivo de filtración de virus (p.ej., Viresolve® Pro).

40 La Figura 11 ilustra el orden en el que se conectan estas operaciones unitarias.

45 Se pueden incluir las bombas necesarias, sensores de conductividad y UV de forma adicional.

50 Todos los dispositivos se humedecieron individualmente en una estación diferente y después se ensamblan. Los dispositivos se humedecen y se tratan previamente de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se lava por descarga el filtro de lecho profundo (calidad A1HC) con 100 l/m<sup>2</sup> de agua seguido de 5 volúmenes de tampón en equilibrio 1 (EB1; tampón de elución de Proteína A ajustado a pH 7,5 con 1 M Tris base, pH 11). Se rellena una columna de 2,5 cm Omnit con 2,5 ml de carbón activado tal como se describen en la solicitud de patente provisional estadounidense co-pendiente No. 61/575,349, registrada el 19 de agosto 19, 2011, para producir una carga de MAb de 0,55 kg/l. Se lava por descarga la columna con 10 CV de agua y después se equilibra con EB1 hasta que se estabiliza el pH a un pH 7,5. Se conectan dos dispositivos ChromaSorb (0,2 y 0,12 ml) en serie para conseguir una carga de anticuerpo de 4,3 kg/l. Se humedecen los dispositivos con agua a 12,5 CV/min durante al menos 10 minutos, seguido de 5 DV EB1. Se utiliza una mezcladora estática con hélice desechable (Koflo Corporation, Cary, IL) con 12 elementos para realizar ajustes del pH en línea. Se conectan dispositivos de 1,2 ml que contienen Membrana 7 en paralelo para eliminar los agregados, de manera que se pueden cargar aproximadamente 570 mg/ml de anticuerpo.

60

Se humedecen con 10 DV de agua seguido de 5 DV de tampón de equilibrio 2 (EB2; EB1 ajustado a un pH 5,0 utilizando 1 M de ácido acético). Se trataron los dispositivos posteriormente con 5 DV (volúmenes de dispositivo) de EB2 + 1 M NaCl y a continuación, se equilibró con 5 DV EB2. Se humedeció un dispositivo de 3,1 cm<sup>2</sup> VireSolve® Pro con agua presurizada a 30 psi (207 kPa) durante al menos 10 min. A continuación, se lleva un seguimiento del caudal cada minuto hasta que el caudal permanece constante durante 3 minutos seguidos. Después de humedecer y equilibrar todos los dispositivos, se conectan, tal como se muestra en la Figura anterior. Se hace correr EB1 a través de todo el sistema hasta que las lecturas de la presión y las lecturas del pH se estabilizan. Tras el equilibrio, se pasa el material de alimentación (elución de Proteína A ajustada a un pH 7,5) a través del tren de flujo continuo. Durante el ciclo, se recogen las muestras antes del tanque de compensación y después de Viresolve® Pro para controlar la concentración de IgG y los niveles de impurezas (HCP, DNA, PrA lixiviado y los agregados). Después de procesar el material de alimentación, se lava por descarga el sistema con 3 volúmenes muertos de EB1 para recuperar la proteína en los dispositivos y en el bombeo.

El material de alimentación para el proceso de flujo continuo conectado es eluato de Proteína A de MAb IV, producido en un proceso de proteína discontinuo. El nivel natural de agregados en este MAb no excede 1 %, de manera que se desarrolló un procedimiento especial para aumentar el nivel de agregados. Se elevó el pH de la solución a 11 con NaOH acuoso, con agitación suave y se mantuvo durante 1 hora. A continuación, se redujo el pH lentamente a pH 5, con HCl acuoso, con agitación suave. Se repitió el ciclo del pH 4 veces más. El nivel de agregados final es aproximadamente 5 %, que consisten sobre todo en dímeros y trímeros de MAb IV según se mide por SEC. A continuación, se dializa la corriente de alimentación en tampón Tris-HCl, pH 7,4, conductividad aproximadamente 3 mS/cm.

El material de alimentación de MAb procesado para este ciclo es 102 ml de 13,5 mg/ml MAb IV a un caudal de 0,6 ml/min.

El paso sin retención de HPC en función de la carga de dispositivo tras ChromaSorb está por debajo del límite superior de 10 ppm (Figura 12). Los agregados se reducen de 5 % a 1,1 % con el dispositivo CEX (Figura 13). El rendimiento de MAb IV del proceso conectado es 92 %. La tasa de transferencia del dispositivo Viresolve® Pro fue > 3,7 kg/m<sup>2</sup>.

Los Ejemplos 13-19 demuestran la viabilidad de la fabricación de composiciones para eliminar agregados en un modo de flujo continuo utilizando una resina de intercambio catiónico o fibras de malla al azar como soportes sólidos en lugar de una membrana.

### **Ejemplo 13. Preparación de resina de intercambio catiónico (CEX) fuerte polimérica modificada con un copolímero de injerto de AMPS/DMAM**

En este experimento representativo, se preparó una serie de resinas de intercambio catiónico (CEX) con una superficie de copolímero AMPS/DMAM injertada (CEX fuerte) con una densidad variable de grupos de unión, que son radicales de ácido sulfónico con carga negativa. La densidad de ligandos y la composición el grupo de intercambio catiónico fuerte se controla mediante la composición de la solución reactiva utilizada para la modificación superficial. Para variar la densidad de los grupos de intercambio catiónico fuertes, se añadieron los monómeros reactivos cargados y sin cargar AMPS y DMA en varias relaciones molares.

Se marca un matraz de tres bocas de 1000 ml con agitador mecánico y embudo de vertido a un volumen definido de 830 ml. En este matraz, se disuelven 8,25 g de hidróxido sódico en 429,34 g de agua desionizada. Se enfría la solución a 0°C y se añaden 13,68 g de AMPS lentamente en varias porciones mientras se agita. A continuación, se añaden 26,22 g de DMAM. Se ajusta el valor de pH de la solución a 6,0-7,0 por adición de 65 % ácido nítrico y/o 1 M de hidróxido sódico. Se añaden 400 ml de resina de perla de base polimérica sedimentada con un tamaño de partícula medio de 50 micrómetros a la solución con agitación suave (120 rpm). Se ajusta el volumen total de la mezcla de reacción a 830 ml (de acuerdo con la marca) mediante la adición de agua desionizada. Se vuelve a ajustar el valor de pH de la mezcla a un pH de 6,0 a 7,0 mediante la adición de 65 % de ácido nítrico. Se agita la mezcla suavemente (120 rpm) y se calienta a 40 °C. Se añade una solución de 6,75 g de nitrato de amonio y cerio (IV) y 2,96 g de ácido nítrico al 65 % en 15 g de agua ionizada rápidamente con agitación vigorosa (220 rpm). A continuación, se agita la mezcla de reacción a 120 rpm a 40 °C durante 3 horas.

A continuación, se vierte la mezcla de reacción en una frita de vidrio (porosidad P3) y se separa el sobrenadante por succión. Se lava la resina restante sucesivamente con las siguientes soluciones: 3 x 400 ml de agua desionizada; 10 x 400 ml 1 M ácido sulfúrico + 0,2 M ácido ascórbico; 3 x 100 ml de agua desionizada; 10 x 400 ml de agua desionizada caliente (60 °C); 2 x 400 ml de agua desionizada; 2 x 400 ml de hidróxido sódico 1 M; 2 x 100 ml de agua desionizada; durante una segunda etapa de lavado con agua desionizada, ajuste del pH a 6,5-7,0 con ácido clorhídrico al 25 %; 2 x 400 ml etanol al 70 % / agua desionizada al 30 %; 2 x 100 ml de agua desionizada; y 2 x 100 ml de etanol al 20 % / agua desionizada al 80 % + 150 mM NaCl.

Una vez completado el procedimiento de lavado indicado, se almacena la resina como una suspensión 1:1 (v/v) en una solución de etanol al 20 %, agua desionizada al 80 % y 150 mM NaCl.

En la Tabla 9 se enumeran las resinas CEX fuertes que contienen ácido sulfónico sintetizadas con diversas relaciones molares de AMPS y DMAM preparadas de acuerdo con este ejemplo.

Tabla 9: Resinas CEX sintetizadas preparadas de acuerdo con este Ejemplo

Ejemplo	No. lote Interno	Cantidad molar de DMAM [mol]	Cantidad molar AMPS [mol]	Relación molar DMAM/AMPS	Capacidad iónica [meq/ml]
A	12LP-DZ105	0,30	0,075	4	32,5
B	12LP-DZ128	0,375	0,075	5	27,7
C	12LP-DZ129	0,45	0,075	6	24,7
D	12LP-DZ119	0,00	0,075	SO <sub>3</sub> Puro	12,0

5 **Ejemplo 14. Eliminación de agregados de un material de alimentación de anticuerpo monoclonal utilizando una resina de intercambio catiónico (CEX) fuerte polimérica modificada con copolímero de injerto AMPS /DMAM**

10 Se rellenó con muestras de resina Lote no. 1 2LPDZ11 9, 1 2LPDZ1 28 y 1 2LPDZ1 29 una columna de cromatografía Omnifit® con un diámetro interno de 6,6 mm a una altura de lecho de 3 cm con el resultado de aproximadamente 1 ml de lecho de resina rellena. Se equipó un sistema de cromatografía Explorer 100 AKTA y se equilibró con tampones apropiados para explorar estas columnas para cromatografía de flujo continuo (Tabla 10).  
 15 Se cargaron las columnas de cromatografía que contenían muestras de resina 1 2LPDZ11 9, 1 2LPDZ1 28 y 12LPDZ129 sobre el sistema de cromatografía con tampón de equilibrio. El material de alimentación fue IgG1 (MAbB) que se purificó utilizando un medio de cromatografía de afinidad ProSep® Ultra Plus y se ajustó a un pH 5,0 con 2 M Tris base. La concentración final de MAbB de la reserva de proteína A fue 13,8 mg/ml, contenía 2,05 % de producto agregado y la conductividad fue aproximadamente 3,5 mS/cm. Se cargaron las resinas a un tiempo de residencia de 3 minutos y una densidad de carga de 414 mg/ml.

20 Tabla 10: Método para realizar experimentos de cromatografía para las muestras de resina Lote No. 12LPDZ119, 12LPDZ128 y 12LPDZ129

Método de rastreo de cromatografía de flujo continuo de resinas 12LPDZ119, 12LPDZ128 y 12LPDZ129			
Etapas	Solución	Tiempo de residencia (minutos)	Volúmenes de columna
Equilibrio	50 mM acetato sódico pH 5	3	8
Carga	50 mM acetato sódico pH 5 con 13,8 mg/ml mAbB	3	30 (414 mg Proteína/ml Resina)
Lavado	50 mM acetato sódico pH 5	3	10
Depuración	50 mM acetato sódico pH, 750 mM NaCl	3	5
Lavado <i>in situ</i>	0,5 M NaOH	3	5
Equilibrio	50 mM acetato sódico pH 5	3	5

25 Se recogió el flujo continuo en fracciones de 2 ml y se sometieron a ensayo para determinar el total de concentración de proteína en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 y se determinó cuantitativamente el contenido de agregado por cromatografía de líquidos de alto rendimiento por exclusión de tamaño (SE-HPLC). Se llevó a cabo el ensayo de cuantificación de agregados Tosoh Bioscience TSKGel G3000SWXL, 7,8 mm x 30 cm, 5 µm (Catálogo No. 08541) columna con tampón de equilibrio de 0,2 M fosfato sódico, pH 7,2. Los resultados muestran que se recoge la proteína monomérica mAbB en la fracción de flujo continuo en altas concentraciones a cargas de proteína acumulativa relativamente mucho menores que el producto agregado.

30 Para el Lote No. 12LPDZ119, se recuperaron 368,1 mg o aproximadamente 88,9 % de proteína a una carga acumulativa de proteína de 414 mg/ml, se redujo el nivel de agregado de 2,05 % a 0,39 % en las fracciones de flujo continuo, y la reserva de depuración contenía 21,2 % de agregados lo que sugiere la capacidad de la resina para retener agregados selectivamente.

35 Para el Lote No. 12LPDZ128, se recuperaron 357,9 mg o aproximadamente 86,4 % de proteína a una carga de proteína acumulativa de 414 mg/ml, se redujo el nivel de agregados de 2,05 % a 0,14 % en las fracciones de flujo continuo y la reserva de depuración contenía 13,4 % de agregados lo que indica la capacidad de la resina para retener agregados selectivamente.

40 Para el Lote No. 12LPDZ129, se recuperaron 359,9 mg o aproximadamente 86,9 % de proteína a una carga de proteína acumulativa de 414 mg/ml, se redujo el nivel de agregado de 2,05 % a 0,52 % en las fracciones de flujo continuo y la reserva de depuración contenía 16,8 % de agregados lo que indica la capacidad de las resinas para

retener agregados selectivamente.

La Figura 14 representa el paso sin retención del monómero mAbB y agregados para el Lote No. 12LPDZ119; La Figura 15 representa el paso sin retención de monómero MAbB y agregados para el Lote No. 12LPDZ128; y la Figura 16 representa el paso sin retención de monómero MAbB y agregados para el Lote No. 12LPDZ129.

Tal como se demuestra en la Figura 14, con la resina del Lote No. 12LPDZ119, la concentración de MAbB recogida en las fracciones de flujo continuo alcanza > 90 % de su concentración de carga original con 110 mg/ml de carga de proteína acumulativa. En cambio, el nivel de agregado fue de solamente 0,56 % o 27,8 % de la concentración de carga original a 414 mg/ml de carga de proteína acumulativa. Esto indica que la resina retiene selectivamente especies agregadas para cargas alta de proteína al mismo tiempo que permite la recuperación de monómero de proteína MAb) a un 88,9 % de su masa inicial total.

Tal como se demuestra en la Figura 15, con la resina del Lote No. 12LPDZ128, la concentración de mAbB recogida en las fracciones de flujo continuo alcanza > 90 % de su concentración de carga original con 138 mg/ml de carga de proteína acumulativa. En cambio, el nivel de agregado fue de solamente 0,42 % o 20,9 % de la concentración de carga original a 414 mg/ml de carga de proteína acumulativa. Esto indica que la resina retiene selectivamente especies agregadas para cargas altas de proteína al mismo tiempo que permite la recuperación del monómero de proteína a un 86,4 % de su masa inicial total.

Tal como se demuestra en la Figura 16, con la resina del Lote No. 12LPDZ129, la concentración de mAbB recogida en las fracciones de flujo continuo alcanza > 90 % de su concentración de carga original con 110 mg/ml de carga de proteína acumulativa. En cambio, el nivel de agregado fue solamente 0,99 % o 49,2 % de la concentración de carga original a 414 mg/ml de carga de proteína acumulativa. Esto indica que la resina retiene selectivamente especies agregadas para cargas altas de proteína al mismo tiempo que permite la recuperación del monómero de proteína a un 86,9 % de su masa inicial total.

#### **Ejemplo 15. Preparación de una resina (CEX) de intercambio catiónico fuerte modificada con un copolímero de injerto AMPS/DMAM**

En un tarro de vidrio de 250 ml, se añadieron 64 ml de una torta húmeda de resina de cromatografía Toyopearl HW75-F A continuación, se añadieron, 115 g de hidróxido sódico 5M, 18,75 g de sulfato sódico y 4 ml de éter alil glicídico (AGE) al tarro que contenía la resina. A continuación, se colocó el tarro en un hibridador a 50°C durante toda la noche con rotación a velocidad media. Al día siguiente, se drenó el filtro en un conjunto de filtro de vidrio sinterizado (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) y se lavó la torta húmeda con metanol y después de aclaró con agua desionizada. En un vial de vidrio, se añadieron 10 ml de la torta húmeda de la resina AGE activada. Se añadieron al vial de vidrio, 0,2 g de persulfato de amonio, 0,3 g de AMPS, 1,2 g de DMAM y 48 g de agua desionizada y se calentaron los viales a 60°C durante 16 horas. Al día siguiente, se drenó por filtración la resina en un conjunto de filtro de vidrio sinterizado (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) y se lavó la torta húmeda con una solución de metanol y agua desionizada y se etiquetó la resina como Lote No. 1712.

#### **Ejemplo 16. Eliminación de agregados a diferentes tiempos de residencia de un material de alimentación de anticuerpo monoclonal utilizando una resina de intercambio catiónico (CEX) polimérica modificada con un copolímero de injerto AMPS/DMAM**

Se rellenó con resina resultante, Lote # 1712 del Ejemplo 14 una columna de cromatografía Omnifit® con un diámetro interno de 6,6 mm a una altura de lecho de 3 cm con el resultado de aproximadamente 1 ml de lecho de resina rellena. Se equipó un sistema de cromatografía AKTA Explorer 100 y se equilibró con tampones apropiados para explorar estas columnas para cromatografía de flujo continuo (similar al ejemplo 14). Se cargaron las columnas de cromatografía que contienen la muestra de resina en un sistema de cromatografía con un tampón de equilibrio. El material de carga fue un material de carga de IgG1 (mAb5) que fue purificado utilizando un medio de cromatografía de afinidad ProSep® Ultra Plus y se ajustó a un pH 5,0 con 2 M base Tris. Se diluyó la concentración final de la reserva de Proteína A a 4 mg/ml, contenía un 5,5 % de producto agregado y una conductividad de aproximadamente 3,2 mS/cm. Se cargó la resina a un tiempo de residencia de 1, 3, o 6 minutos y a una densidad de carga de 144 mg/ml. La fracción máxima de depuración durante el tiempo de residencia de 3 minutos contenía 95,6 % agregados lo que indica un alto nivel de selectividad de especies agregadas. En la tabla 11, a continuación, se representan los resultados.

En la Tabla 11 se representa la retención del monómero y agregados para el Lote No. 1712 con MAb5 a un pH 5,0 a 6, 3, o 1 minutos de tiempo de residencia. Tal como se muestra en la Tabla 11, como promedio, se pueden recoger especies monoméricas a concentraciones cercanas a la concentración de alimentación relativamente pronto en comparación con las especies agregadas para todos los tiempos de residencia sometidos a ensayo, lo que indica que la selectividad es relativamente independiente de los caudales.

Tabla 11

Recogida de flujo continuo	Densidad de carga de proteína acumulativa	Promedio de tiempos de residencia 6, 3, o 1 Minuto	Tiempo de residencia de 6 minutos	Tiempo de residencia de 3 minutos	Tiempo de residencia de 1 minuto
Fracción No.	(mg/ml)	% Proteína en flujo continuo	% Agregados	% Agregados	% Agregados
1	16	13,5	0,0%	0,0%	0,0%
2	32	94,3	0,0%	0,0%	0,0%
3	48	94,4	0,0%	0,0%	0,0%
4	64	95,2	0,0%	0,0%	0,0%
5	80	98,3	0,5%	0,0%	0,0%
6	96	100,0	0,7%	0,3%	0,0%
7	112	99,3	1,1%	0,9%	2,1%
8	128	100,0	2,3%	1,6%	2,8%
9	144	100,0	3,1%	3,6%	4,8%

La Figura 17 representa un cromatograma del Lote No. 1712 con MAb5 a pH a tiempos de residencia de 5 y 3 minutos. Tal como se representa en la Figura 17, la mayor parte del producto se recoge en el flujo continuo y esto lo indica el paso sin retención relativamente rápido de la traza UV de proteína. El tamaño máximo de depuración varía generalmente sobre la base de las condiciones y la masa total cargada pero está relativamente enriquecida con especies de agregado a 95,6 % en comparación con el material cargado que tenía solamente 5,5 % de agregados.

**Ejemplo 17. Purificación de un anticuerpo monoclonal utilizando cromatografía de afinidad de Proteína A seguido del uso de una resina de cromatografía**

En un experimento representativo descrito en el presente documento, se purificó un anticuerpo monoclonal utilizando cromatografía de afinidad de proteína A seguido del uso de una resina de cromatografía de acuerdo con la presente invención. Los resultados de este experimento demuestran un hallazgo inesperado de que los métodos no requerían un aumento de la conductividad o el uso de diluciones cuando se pusieron en marcha en un modo de flujo continuo.

Se expresó una IgG1 (MAb5) en un cultivo celular de células de ovario de hámster chino (CHO). Se clarificó un cultivo celular por filtración de lecho profundo en dos etapas seguido de filtración estéril. En primer lugar se clarificó el cultivo celular que contenía 0,5 mg/ml de mAb5 utilizando medios de cromatografía de afinidad ProSep® Ultra Plus (Proteína A). El tampón de elución de cromatografía de proteína A utilizado fue ácido acético 100 mM. Se ajustó el pH de la reserva de elución de proteína A a un pH de 5,0 utilizando 2 M Tris base y la conductividad de la solución resultante fue aproximadamente 3,5 mS/cm. Se hizo correr la resina Lote No. 1712 en un modo de flujo continuo de acuerdo con el método descrito en el presente documento a un tiempo de residencia de 3 minutos y se recogieron fracciones de flujo continuo y se reservaron pequeñas partes alícuotas para el ensayo.

Se agruparon las fracciones de flujo continuo, se ajustaron a un pH 7,5 y se hicieron correr en modo de flujo continuo utilizando o bien ChromaSorb, que es un absorbente de membrana de intercambio aniónico tolerante de sal, que se cargó a 5 kg/l o bien Fractogel TMAE que es una resina de intercambio aniónico que se cargó a 150 mg/ml. Se sometieron a ensayo las fracciones para la concentración de proteína, nivel de agregado, proteína A lixiviada y proteínas de ovario de hámster china (CHOP). En la tabla 12, a continuación, se muestran los resultados.

Tabla 12

Etapa 1	Etapa / Carga de proteína	% Recuperación para Etapa	% Agregados en reserva	Proteína A lixiviada reserva (ppm)	CHOP en reserva(ppm)
	Reserva cromatografía de afinidad de Proteína A	97	5,40	251	24000
	Resina Lote No. 1712 corrida en modo de flujo continuo tal como se describe en el presente documento				
Etapa 2	16	14	0,00	0,4	1
	32	94	0,00	1,8	1300
	48	94	0,00	1,9	4400
	64	95	0,00	2,1	9300
	80	98	0,50	2,4	19400

Etapa 3 o	96	100	0,70	2,5	24800
	112	99	1,10	3,1	25500
Etapa 3	Reserva CIEx FT	> 90 %	<0,5 %	0,8 (ppm)	11500 (ppm)
	Absorbente membrana de intercambio aniónico ChromaSorb	> 90 %	< 0,5%	NA	60
	Fractogel TMAE	> 90 %	< 0,5%	NA	200

Normalmente, un proceso de purificación cromatográfica implica una cromatografía de intercambio catiónico de unión y elución como etapa anterior a la cromatografía de intercambio aniónico y además requiere una etapa de dilución o una etapa de intercambio de tampón para reducir la conductividad a un nivel que es adecuado para la cromatografía de intercambio aniónico de flujo continuo. Sin embargo, tal como se muestra en la Tabla 12, los procesos descritos en el presente documento utilizando medios de intercambio catiónico de acuerdo con la presente invención no requieren un aumento de la conductividad para operar y, en consecuencia, no requieren una etapa de dilución o una etapa de intercambio de tampón antes de la etapa de purificación.

#### 10 **Ejemplo 18. Preparación de fibra de malla dispuesta al azar de intercambio catiónicos (CEX) fuerte modificada con un copolímero de injerto AMPS/DMAM**

En este experimento representativo, se utilizaron fibras de malla al azar de intercambio catiónico como soporte sólido.

15 Se combinaron en un tarro de vidrio de 1 l, 20 g de fibras varios lóbulos de nilón, o fibras de mallas dispuestas al azar, con 400 g de hidróxido sódico 4M, 24 g de sulfato sódico y 160 ml de éter alil glicólico (AGE). A continuación, se colocó el tarro en un hibridador a 50 °C durante toda la noche girando a una velocidad media. Al día siguiente, se filtraron las fibras en un conjunto de filtro de vidrio sinterizado y se lavaron las fibras con metanol y se aclararon con agua Milli-Q. Un día después, se lavaron las fibras con agua, seguido de metanol y después agua de nuevo, se succionó para obtener una torta seca y se secó en un horno de vacío a 50 °C durante 1 día. Se etiquetó la muestra resultante Muestra No. 1635. En tres viales de vidrio por separado, se pesaron 2 gramos de una torta seca de la muestra No. 1635, fibras AGE activadas, y se añadieron a un vial de vidrio para modificarlo adicionalmente por injerto. Se añadieron al vial de vidrio persulfato amónico, AMPS, DMAM y agua desionizada en las cantidades especificadas en la Tabla 13 y se calentó el vial a 60 °C durante 16 horas con rotación continua. Al día siguiente, se filtraron las muestras de fibra en un conjunto de filtro de vidrio sinterizado y se lavó la torta húmeda con una solución de agua desionizada. Se etiquetaron los viales que contenían las fibras como Lote # 1635-1, 1635-2 y 1635-5. A continuación, se tituló el Lote No. 1635-5 en cuanto a la reducida capacidad iónica, que según se observó era aproximadamente 28  $\mu$ moles/ml. A continuación, se dio por supuesto que las muestras No. 1635-1 y No. 1635-2 tenían también una capacidad iónica reducida inferior a 28  $\mu$ moles/ml.

Tabla 13

Ingredientes	No.1635-1	No.1635-2	No.1635-5
Fibras (g)	2,0	2,0	2,0
Persulfato amónico (g)	0,18	0,18	0,18
AMPS (g)	0,48	0,60	0,72
DMAM (g)	0,48	0,60	0,72
Agua (g)	28,86	28,62	28,38

#### 35 **Ejemplo 19: Eliminación de agregados de una corriente de alimentación de anticuerpo monoclonal utilizando fibras de mallas dispuestas al azar de intercambio catiónico fuerte (CEX) modificadas con copolímero injertado de AMPS/DMAM**

Se rellenó una columna de cromatografía Omnifit® con las fibras de malla dispuestas al azar modificadas resultantes, Lote no. 1635-1, no. 1635-2, no. 1635-5 del Ejemplo 17 en una columna de cromatografía con un diámetro interno de 6,6 mm hasta una altura de lecho de 3 cm con el resultado de un lecho de fibra relleno de aproximadamente 1 ml. Se equipó un sistema de cromatografía AKTA Explorer 100 y se equilibró con tampones apropiados para explorar estas columnas para cromatografía de flujo continuo (similar al Ejemplo 13). Se cargaron columnas de cromatografía que contienen las muestras de fibra de malla dispuestas al azar sobre el sistema de cromatografía con un tampón de equilibrio. El material de alimentación fue un material de alimentación de IgG1 (mAb5) purificado mediante el uso de cromatografía de afinidad de proteína A y se ajustó a un pH 5,0 con 2 M Tris base. La concentración final de la reserva de proteína A fue 4 mg/ml y contenía 5,5 % de agregado o producto HMW. Se rellenaron las columnas con fibra Lote no. 1635-1 y Lote no. 1635-2 a una carga de masa de 64 mg/ml y se cargó la columna con fibra Lote1635-5 a una carga de masa de 80 mg/ml. En la Tabla 14 a continuación se

# ES 2 644 744 T3

representan los resultados.

Tabla 14

\*N/A = no aplicable

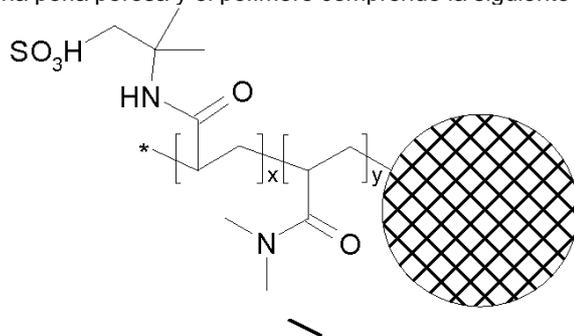
Carga de proteína acumulativa mg/ml	Fibra Lote No. 1635-1			Fibra Lote No. 1635-2			Fibra Lote No. 1635-5		
	Monómero (%)	Dímeros (%)	LMW (%)	Monómero (%)	Dímeros (%)	LMW (%)	Monómero (%)	Dímeros (%)	LMW (%)
8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16	85,8	0,0	14,0	86,0	0,0	15,6	1,7	0,0	10,2
24	84,3	0,0	15,6	85,6	0,0	14,8	51,8	0,0	13,4
32	83,2	0,6	16,0	83,0	0,0	17,1	85,6	0,0	15,1
40	79,4	2,4	17,7	81,1	0,0	14,9	86,5	0,0	13,9
48	79,6	4,4	15,8	82,5	1,5	15,9	83,3	0,0	15,8
56	82,4	4,4	12,8	79,4	2,1	18,3	87,1	0,0	13,1
64	81,1	4,5	14,2	83,1	3,1	14,7	85,4	2,3	13,6
72	N/A*	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	85,7	4,0	13,6
80	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	85,1	5,1	13,8
Máxima depuración	38,0	63,5	0,0	54,4	35,0	11,0	51,3	43,0	5,6

5

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso de flujo continuo para aumentar la pureza de una molécula diana en un eluato de Proteína A, que comprende las etapas de:

- 5 a) contacto del eluato recuperado de una columna de cromatografía de Proteína A con un polímero que incluye dos o más monómeros, en donde el polímero comprende uno o más grupos de unión de intercambio catiónico fijados al mismo, a una densidad de 1 a 30 mM, y el polímero está injertado a través de un engarce en una resina de cromatografía o una perla porosa y el polímero comprende la siguiente estructura:



resina o perla

en la que  $y > x$ ; y

b) obtención de una muestra de flujo continuo de la Etapa a) que comprende la molécula diana,

15 en donde el nivel de agregados en la muestra de fluido continuo es inferior al nivel de agregados en el eluato de Proteína A, aumentando así la pureza de la molécula diana.

2. Un proceso de flujo continuo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el proceso se realiza a una conductividad iónica menor o igual a 10 mS/cm.

20 3. El proceso de flujo continuo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la molécula diana es un anticuerpo monoclonal.

25 4. El proceso de flujo continuo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la molécula diana es una proteína recombinante.

5. El proceso de flujo continuo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la resina de cromatografía o la perla porosa son una perla polimérica de poliéter vinílico o una perla de polímero de polimetacrilato reticulado poroso.

30 6. El proceso de flujo continuo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los agregados son agregados de proteína de orden inferior.

7. El proceso de flujo continuo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los agregados son agregados de proteína de alto peso molecular.

35 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la resina de cromatografía o la perla porosa comprenden un tamaño de partícula medio de entre 10 y 500 micrómetros.

40 9. El proceso de flujo continuo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la resina de cromatografía o la perla porosa comprenden un tamaño de partícula medio de entre 20 y 140 micrómetros.

10. El proceso de flujo continuo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la resina de cromatografía o la perla porosa comprenden un tamaño de partícula medio de entre 30 y 70 micrómetros.

45 11. El proceso de flujo continuo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la resina de cromatografía o la perla porosa comprenden un tamaño de partícula medio de 50 micrómetros.

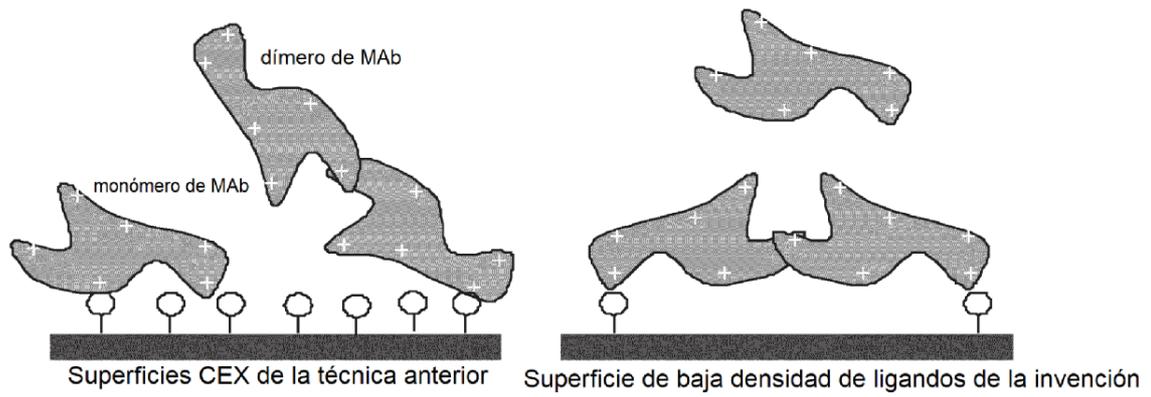


Figura 1

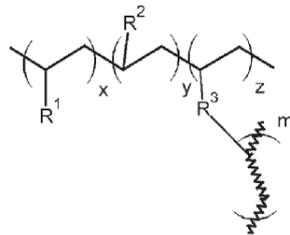


Figura 2A

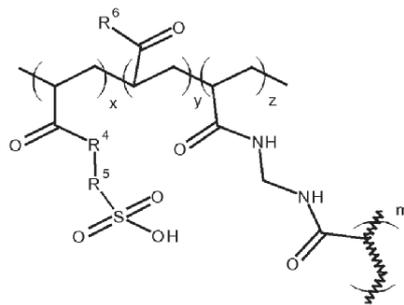


Figura 2B

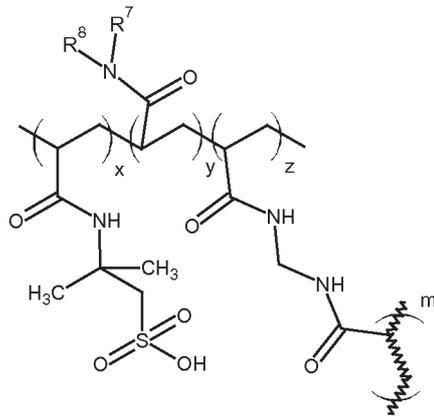


Figura 2C

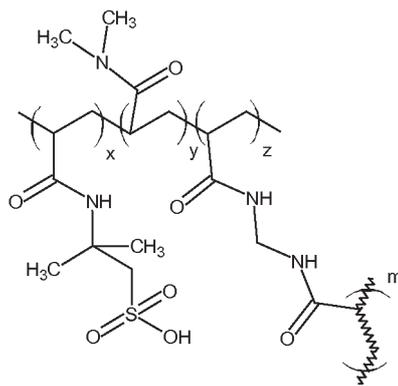


Figura 2D

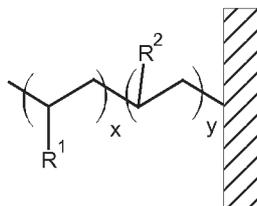


Figura 2E

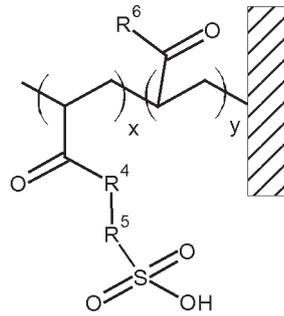


Figura 2F

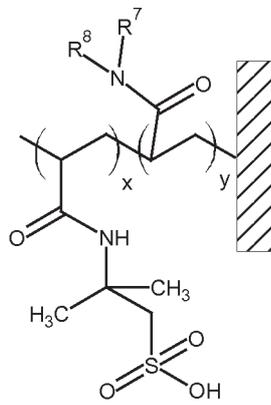


Figura 2G

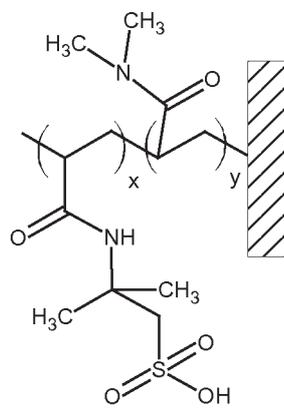


Figura 2H

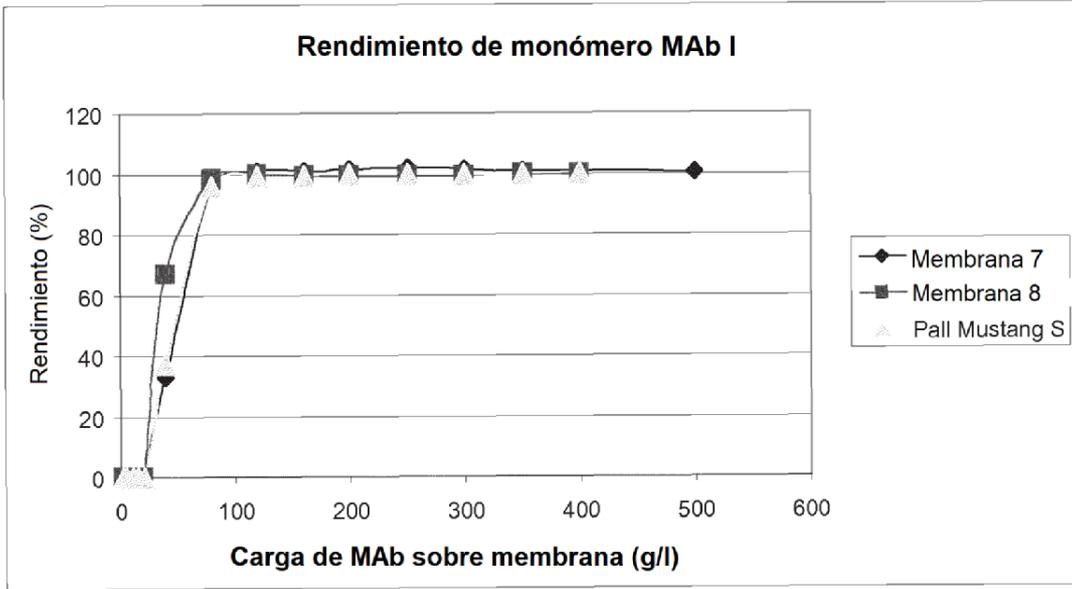


Figura 3A

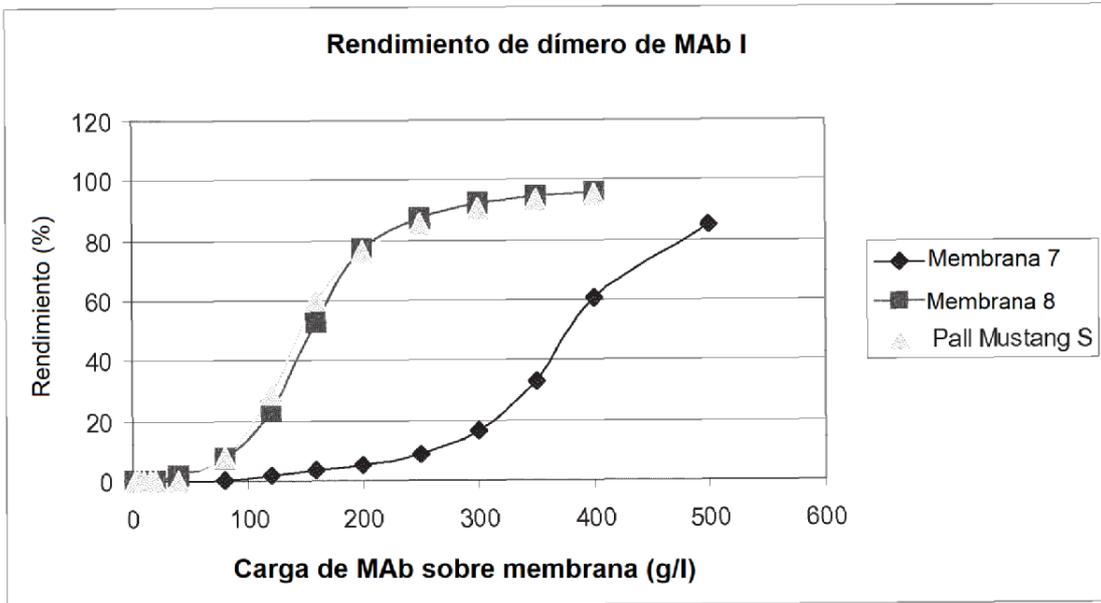


Figura 3B

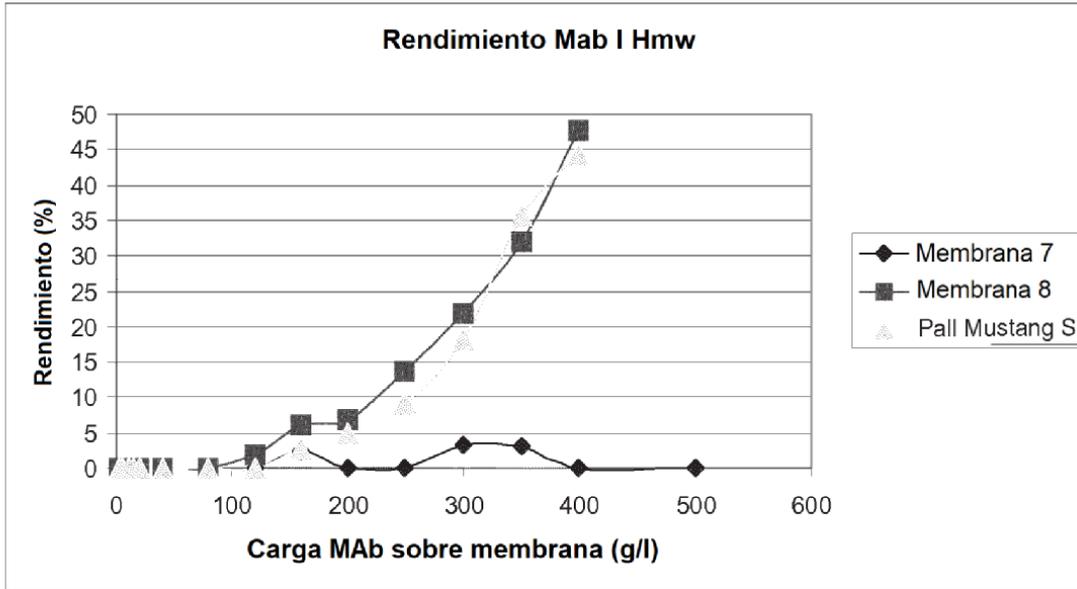


Figura 3C

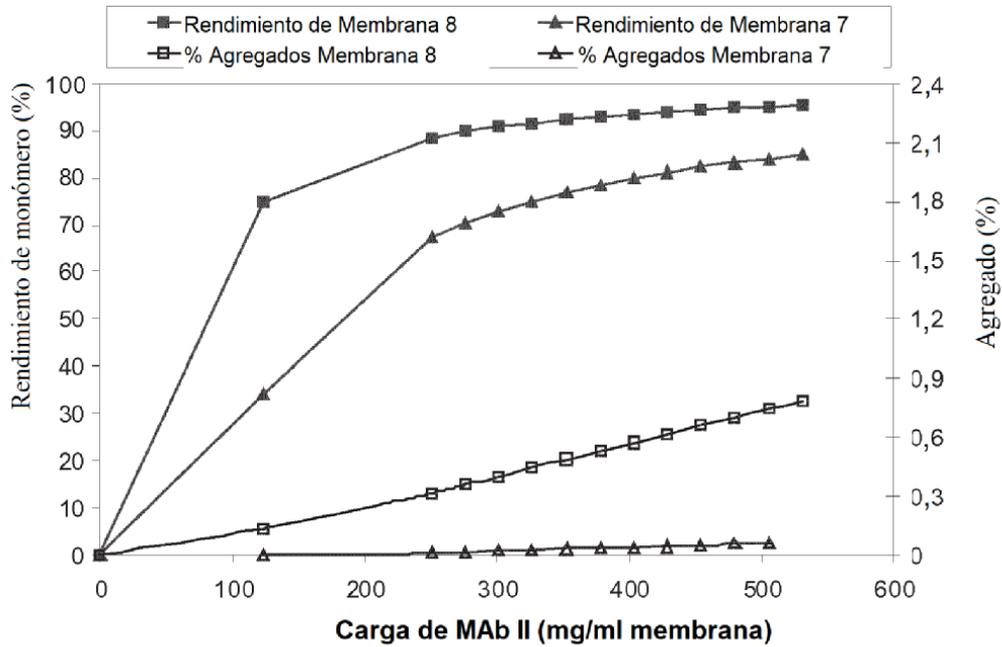


Figura 4A

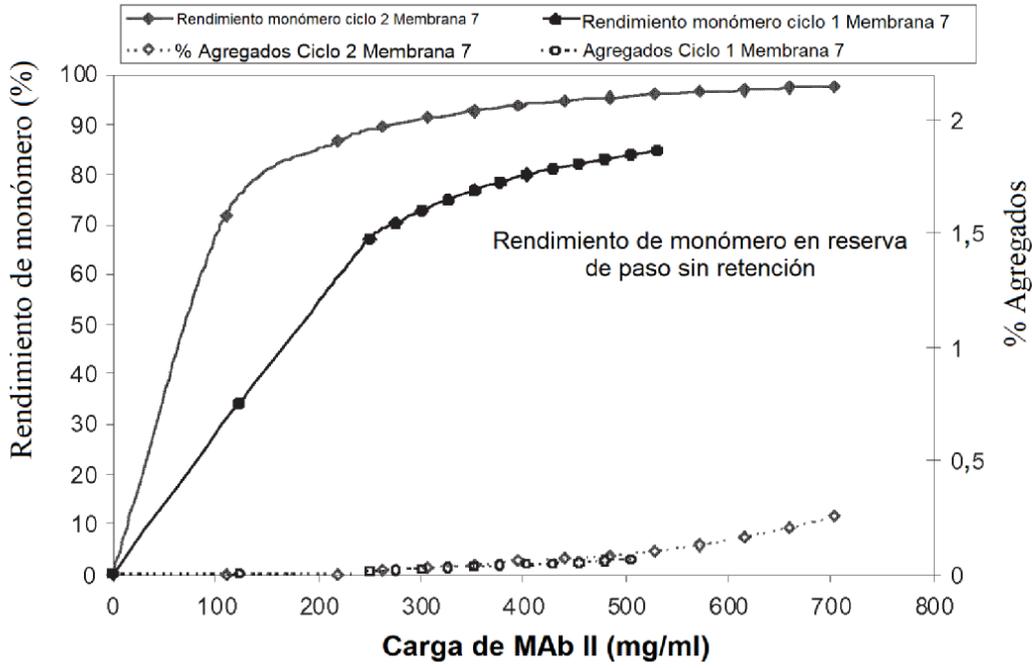


Figura 4B

mAb III sobre membrana 7, 24 s TA, pH 5, 3,5 mS/cm (3,7 % agregados)

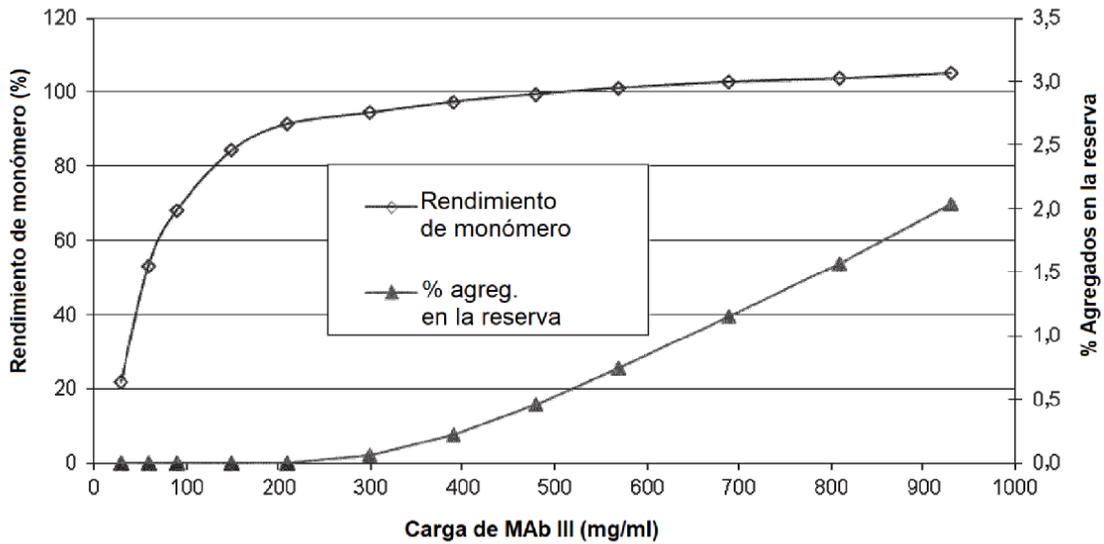


Figura 5

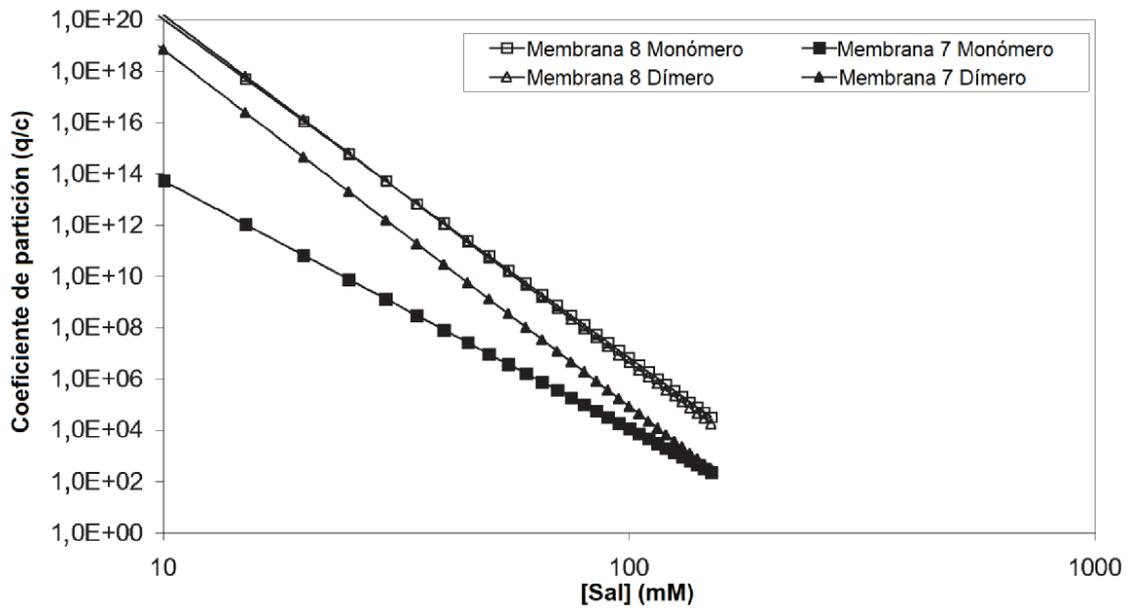


Figura 6A

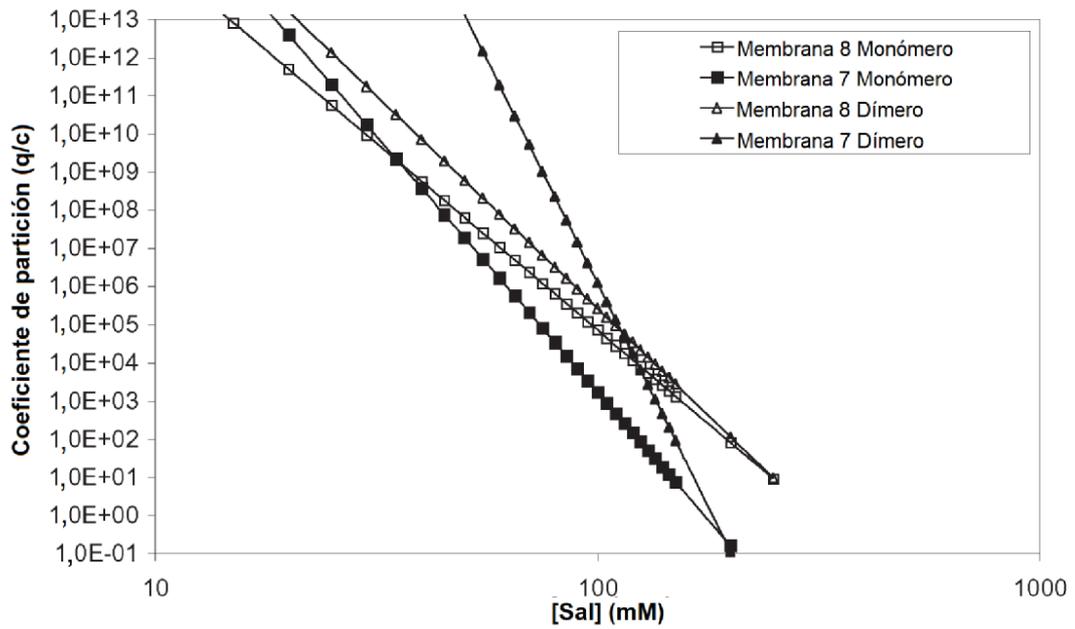


Figura 6B

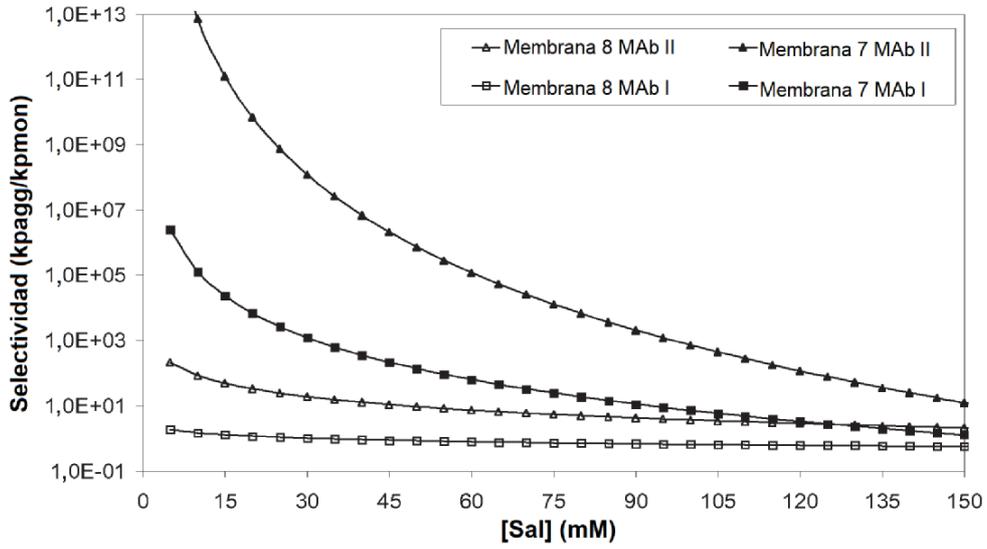


Figura 7

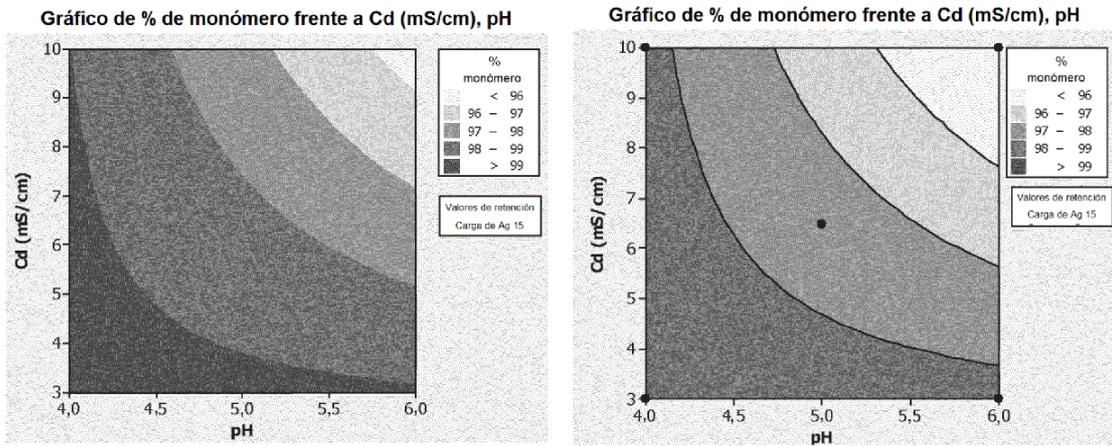


Figura 8

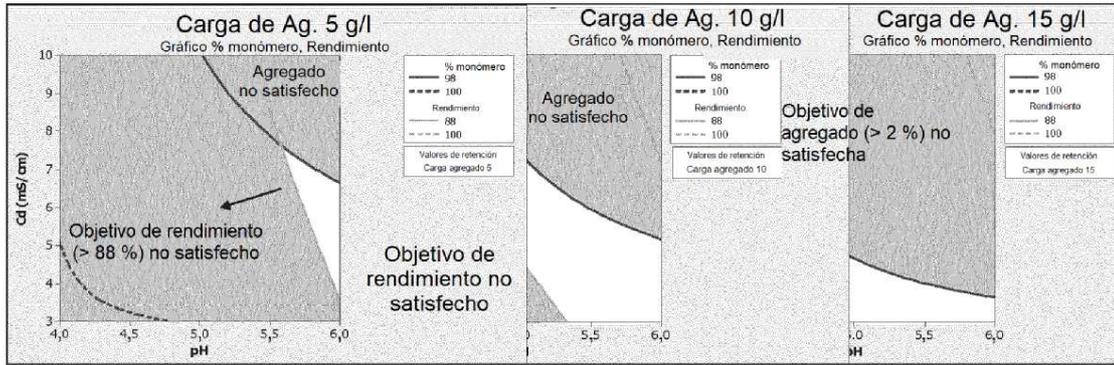


Figura 9

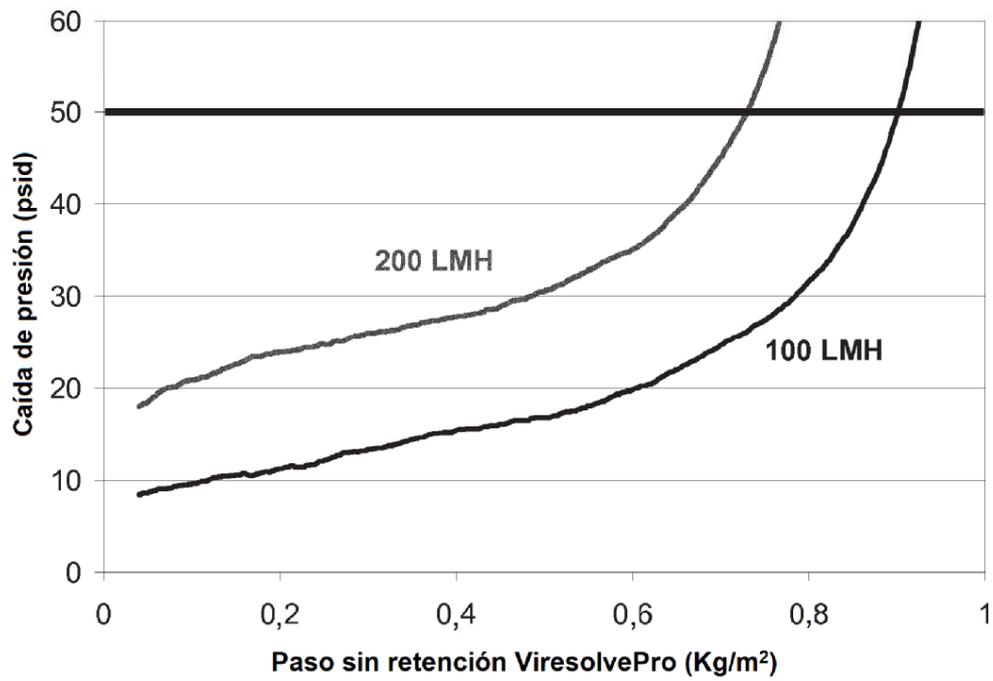


Fig. 10.

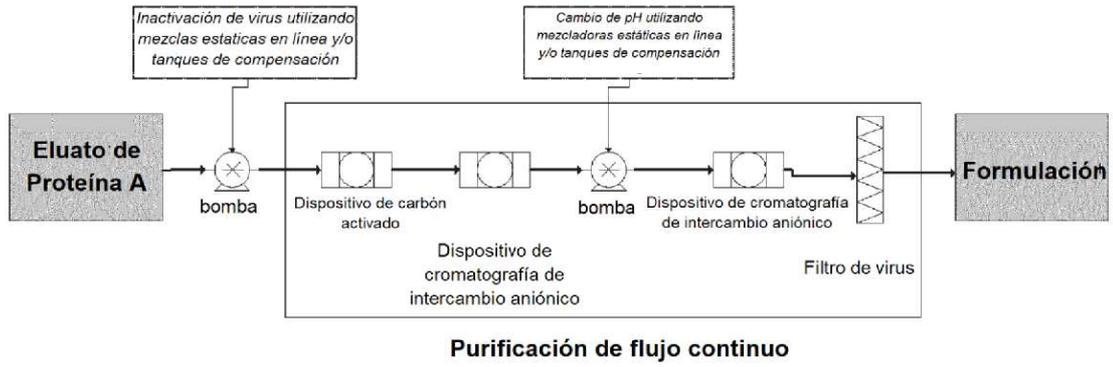


Fig. 11.

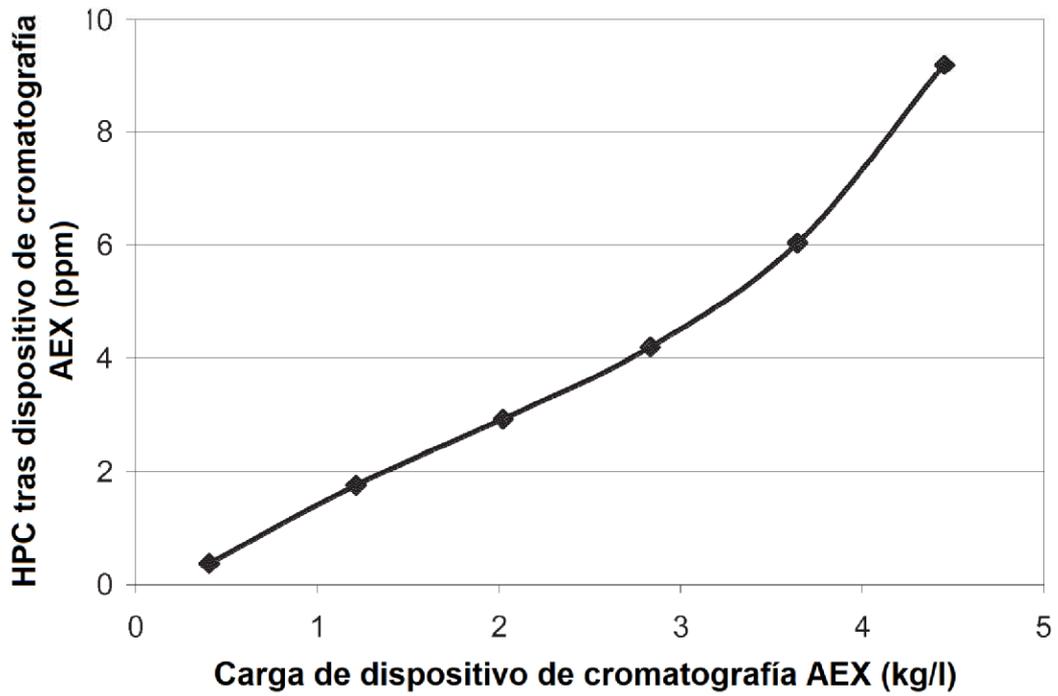


Fig. 12

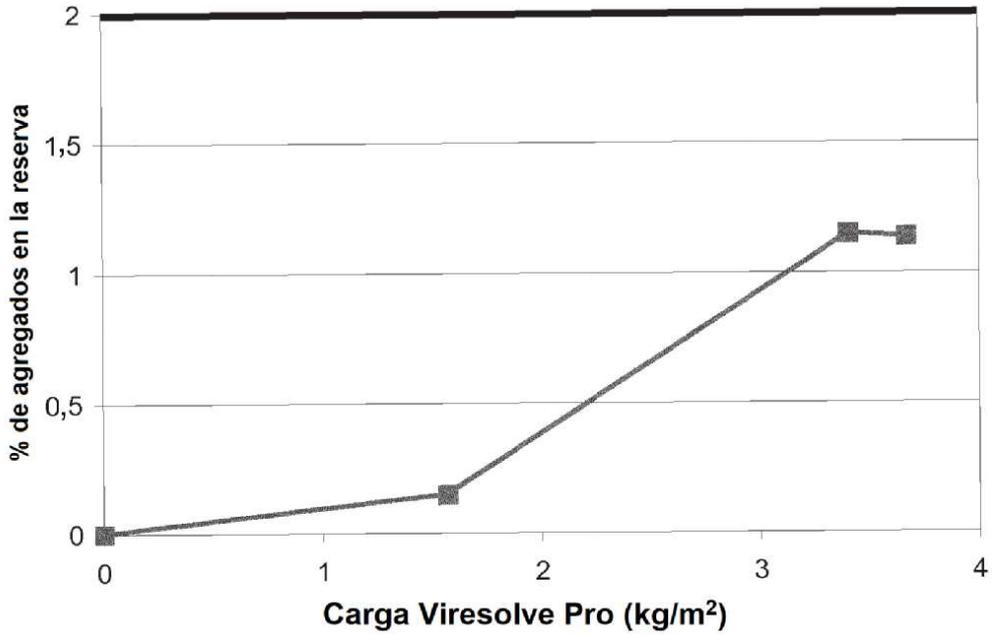


Figura 13

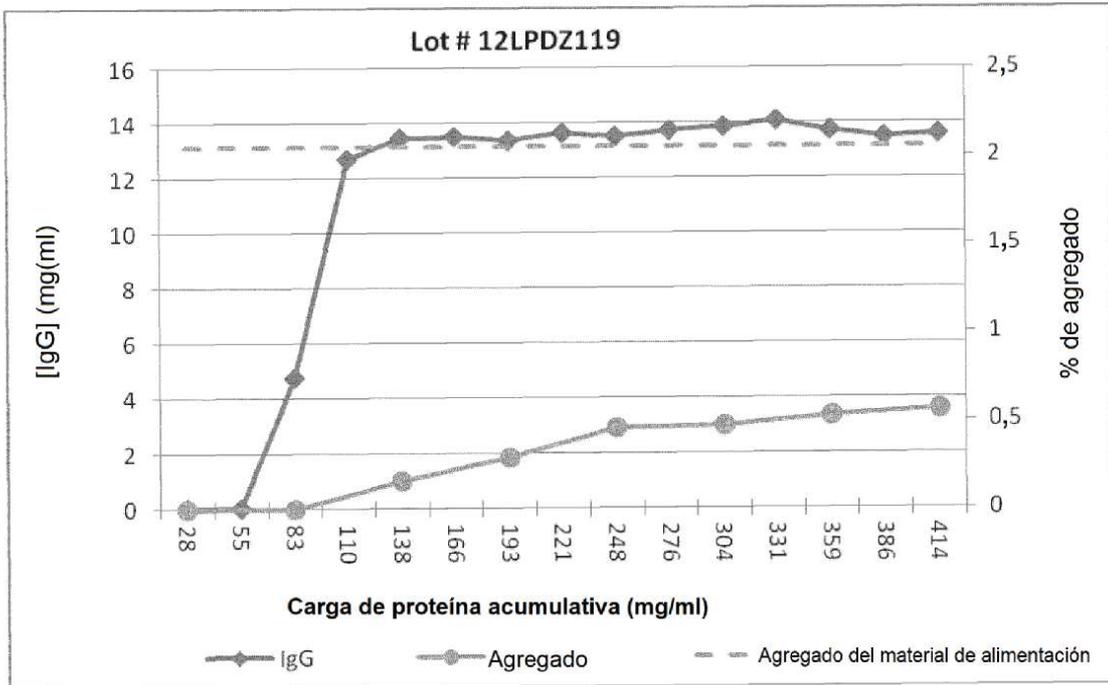


Figure 14

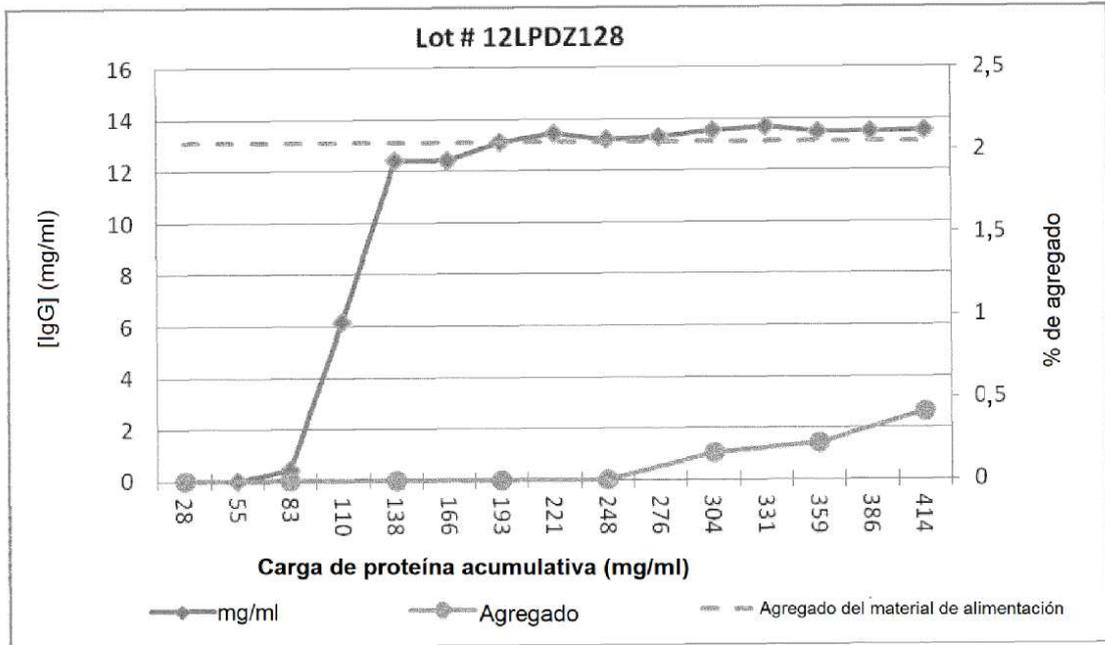


Figura 15

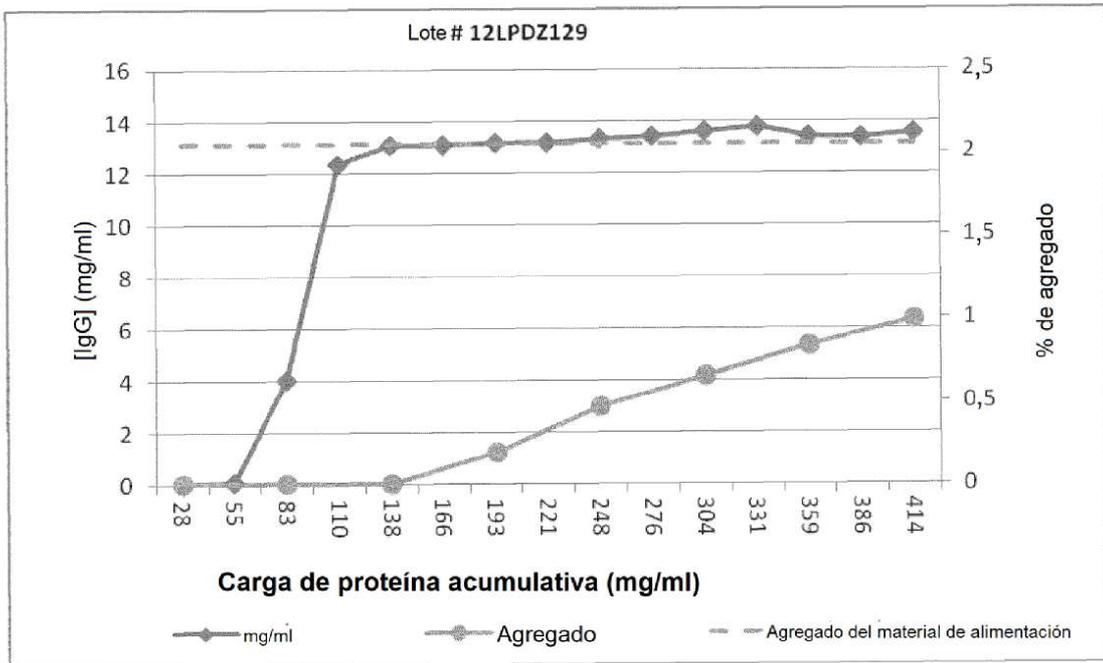


Figura 16

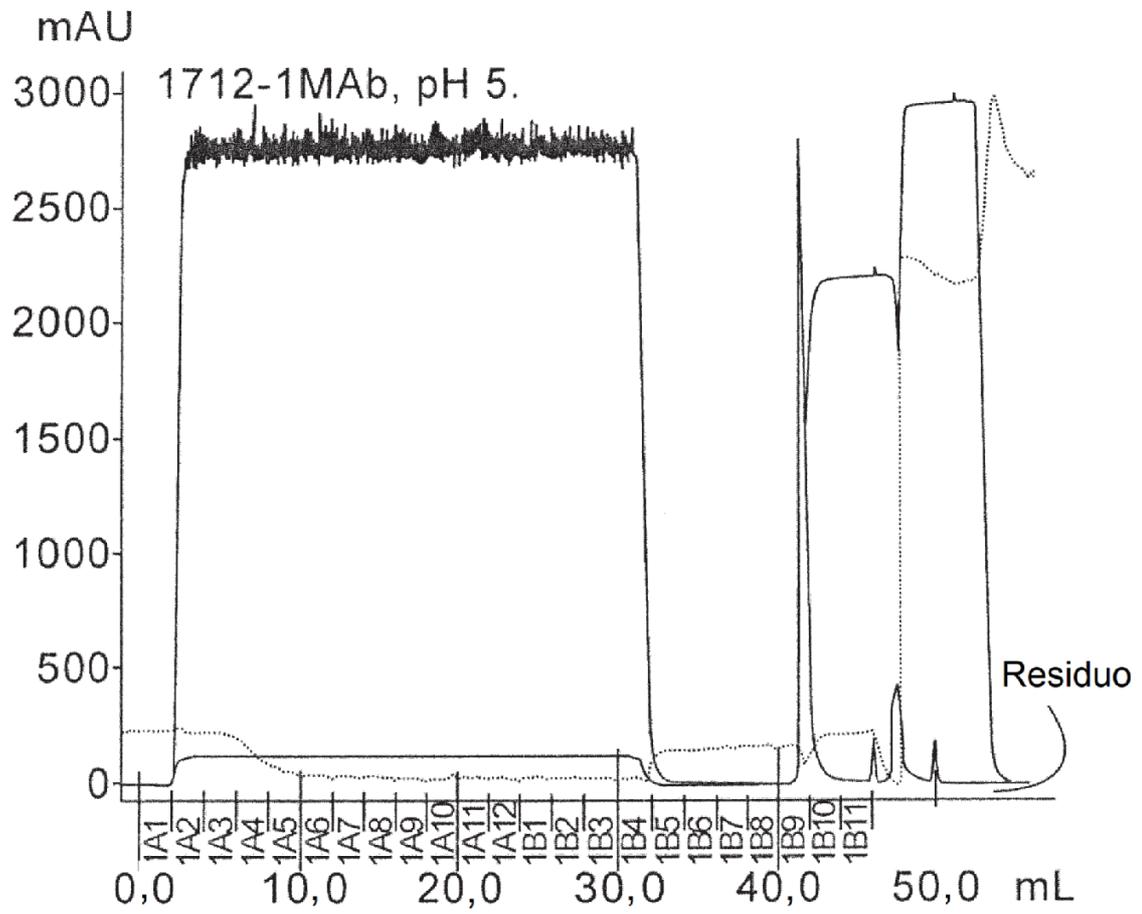


Figura 17