

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 591**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/06** (2006.01)

**C07K 1/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2013 PCT/EP2013/067723**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14033126**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2013 E 13753180 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2890710**

54 Título: **Métodos para la purificación de anticuerpos utilizando alcoholes alifáticos**

30 Prioridad:  
**28.08.2012 US 201261693957 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.12.2017**

73 Titular/es:  
**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse 35  
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:  
**JUNGBAUER, ALOIS;  
SATZER, PETER y  
TSCHELIESSNIG, ANNE-LUISE**

74 Agente/Representante:  
**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 646 591 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

Métodos para la purificación de anticuerpos utilizando alcoholes alifáticos

**Campo de la divulgación**

5 La presente divulgación se refiere a métodos para aislar proteínas utilizando disolventes orgánicos y/u otros reactivos. La invención está definida por las reivindicaciones.

**Antecedentes de la divulgación**

10 La presente divulgación se refiere a la purificación de proteínas por precipitación. La precipitación con etanol es una posible tecnología alternativa a la cromatografía para la purificación de anticuerpos monoclonales (mAb, del inglés *monoclonal antibodies*) de sobrenadantes de cultivo celular. Esta tecnología, establecida por primera vez por Cohn y colaboradores (Cohn et al. 1946) para la producción de inmunoglobulina intravenosa derivada de plasma, se basa en la variación del pH, conductividad, concentración de etanol, concentración de proteínas y de la temperatura. Estos nuevos métodos proporcionan muchas ventajas, incluyendo, por ejemplo, preparaciones de anticuerpos adecuadas para la formulación en productos farmacéuticos, así como importantes beneficios en cuanto al tiempo y costes. Brooks y colaboradores (Brooks et al., Journal of Immunological Methods, Vol. 155 (1992), págs. 129-132) desvelan la purificación de anticuerpos de sobrenadantes de cultivo de hibridoma por precipitación con polietilenglicol.

**Breve descripción de los dibujos**

20 **Figura 1.** Primer método ejemplar.  
**Figura 2.** Influencia de factores principales y de factores principales que interactúan sobre el equilibrio de masas.  
**Figura 3.** Influencia de factores principales sobre el rendimiento de precipitados de IgG.  
**Figura 4.** Influencia de factores principales sobre la pureza del precipitado.  
**Figura 5.** Cromatogramas SEC (cromatografía por exclusión de tamaño) para precipitados disueltos resultantes de las estrategias de purificación A-F (sobrenadante A).  
**Figura 6.** Cromatogramas SEC para precipitados disueltos resultantes de las estrategias de purificación F-K (sobrenadante B).  
**Figura 7.** Cromatogramas SEC para precipitados disueltos resultantes de las estrategias de purificación L-P (sobrenadante C). Todas las estrategias de purificación, excepto la M, se procesaron por duplicado. El precipitado disuelto de la estrategia L es el primer precipitado obtenido.  
**Figura 8.** Cromatogramas SEC para precipitados disueltos resultantes de las estrategias de purificación G, I, C, J y K.  
**Figura 9.** Cromatogramas SEC para precipitados disueltos resultantes de las estrategias de purificación L, M, P, N, O y C.  
**Figura 10.** Segundo método ejemplar.  
**Figura 11.** Resultados ejemplares.  
**Figura 12.** Muestras purificadas.  
**Figura 13.** Muestras purificadas adicionales.  
**Figura 14.** Muestras purificadas.  
**Figura 15.** Efectos de la concentración de etanol sobre la solubilidad (A) y la composición (B).  
**Figura 16.** Efectos adicionales de la concentración de etanol sobre la solubilidad (A) y la composición (B).  
**Figura 17.** Tercer método ejemplar.  
**Figura 18.** A. Primera precipitación con etanol frío. B. Segunda precipitación con etanol frío.  
**Figura 19.** A. Anticuerpo aislado (Bio-SEC3). B. Anticuerpo aislado (TSK G3000Wxl).  
**Figura 20.** A. Anticuerpo aislado (Bio-SEC3). B. Anticuerpo aislado (TSK G3000Wxl).  
**Figura 21.** A. Anticuerpo aislado (Bio-SEC3). B. Anticuerpo aislado (TSK G3000Wxl).  
**Figura 22.** A. Anticuerpo aislado (Bio-SEC3). B. Anticuerpo aislado (TSK G3000Wxl).  
**Figura 23.** A. Anticuerpo aislado (TSK G3000Wxl).  
**Figura 24.** Influencia de la velocidad de agitación, del lavado y de la temperatura/temperatura de la jeringa sobre el rendimiento.  
**Figura 25.** Comparación de diferentes condiciones utilizando jeringa y filtro mantenidos a 4 °C.  
**Figura 26.** Experimentos de disolución después de precipitación a -10 °C.  
**Figura 27.** Curvas de solubilidad de anticuerpo para el sobrenadante A con anticuerpo monoclonal utilizando diferentes alcoholes a 0 °C (a) o a -5 °C (b).  
**Figura 28.** Cromatograma SEC del precipitado disuelto preparado utilizando metanol, etanol o isopropanol a 0 °C (a, b) o a -5 °C (c, d).  
**Figura 29.** Efectos de los niveles de CaCl<sub>2</sub> sobre impurezas (A) y pureza de IgG (B).  
**Figura 30.** Efectos de los niveles de CaCl<sub>2</sub> sobre impurezas (A) y pureza de IgG (B).  
**Figura 31.** Efectos de los niveles de CaCl<sub>2</sub> sobre impurezas.  
**Figura 32.** Pureza de IgG después de la primera etapa de precipitación (A), segunda etapa de precipitación (B),

segunda etapa de precipitación (adición de  $\text{CaCl}_2$  (C)) y segunda etapa de precipitación (adición de  $\text{NaCl}$  (D)).

### Sumario de la divulgación

La presente divulgación se refiere a métodos que resuelven los problemas normalmente encontrados durante la purificación de proteínas tales como anticuerpos. Los métodos descritos en la presente memoria proporcionan sorprendentemente el aislamiento de proteínas de alta pureza (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) con alto rendimiento. En algunas realizaciones, los métodos para el aislamiento de dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo: a) la combinación de un sobrenadante de cultivo celular con una sal catiónica divalente (por ejemplo,  $\text{CaCl}_2$ ) en condiciones adecuadas para la precipitación de impurezas en el sobrenadante, para producir un sobrenadante primario; b) combinar el sobrenadante primario con un alcohol alifático en condiciones adecuadas para formar un precipitado que contiene anticuerpo y aislar el precipitado que contiene anticuerpo; c) volver a suspender el precipitado que contiene anticuerpo en un tampón que comprende una sal catiónica divalente en condiciones adecuadas para la precipitación de impurezas del mismo, para producir una solución que contiene anticuerpo; y d) combinar la solución que contiene anticuerpo con un alcohol alifático en condiciones adecuadas para formar un precipitado que contiene anticuerpo purificado y aislar el precipitado que contiene anticuerpo purificado.

En algunas realizaciones, la etapa a) anterior no está incluida (por ejemplo, la primera etapa de precipitación utiliza un alcohol alifático). En algunas realizaciones, el alcohol alifático puede seleccionarse del grupo que consiste en etanol, metanol e isopropanol. En ciertas realizaciones, una o las dos etapas a) y c) se pueden realizar en menos tiempo que una o las dos etapas b) y d). En algunas realizaciones, la etapa a) se puede realizar en aproximadamente diez minutos o menos y las condiciones de la misma pueden incluir una concentración de fosfato menor o igual a aproximadamente 6 mM (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5,9 mM). En algunas realizaciones, el alcohol alifático de las etapas b) y d) se puede combinar con el sobrenadante o la solución, respectivamente, durante un periodo de tiempo de aproximadamente 30-60 minutos o a una velocidad de alimentación de aproximadamente 10-30  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

El alcohol alifático de las etapas b) y d) puede introducirse a partir de una solución madre que comprende menos de aproximadamente 50 % (v/v) (por ejemplo, 35 % v/v) del alcohol alifático (por ejemplo, la adición lenta de etanol muy diluido). También debe utilizarse un pH adecuado (por ejemplo, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5) en cada una de las etapas, que puede ser igual o diferente entre las diversas etapas. En algunas realizaciones, las condiciones de las etapas a) y c) comprenden un pH de aproximadamente 8,5. En algunas realizaciones, las condiciones de las etapas b) y d) comprenden un pH de aproximadamente 6,5. Las condiciones de las etapas a) y c) pueden comprender también la presencia de una sal catiónica divalente (por ejemplo,  $\text{CaCl}_2$ ). Las condiciones de estas etapas pueden comprender también una conductividad apropiada (por ejemplo, de aproximadamente 8-80 mS/cm). Las condiciones también comprenden normalmente una temperatura adecuada (por ejemplo, una temperatura de aproximadamente  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  a aproximadamente  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ). De este modo, las condiciones de las etapas b) y d) se pueden seleccionar del grupo que consiste en un pH de aproximadamente 6,5, una concentración final (v/v) de alcohol alifático de aproximadamente 25 % y una temperatura de aproximadamente  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ .

En algunas realizaciones, una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) puede aislarse de un sobrenadante de cultivo celular utilizando un método de combinación de un sobrenadante de cultivo celular con  $\text{CaCl}_2$  a aproximadamente un pH de 8,5 y la eliminación de cualquier precipitado resultante para producir un sobrenadante primario; combinar el sobrenadante primario con etanol a partir de una solución madre de menos de aproximadamente 50 % durante un periodo de tiempo de aproximadamente 60 minutos (y/o a una velocidad de alimentación de aproximadamente 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  o menor) a aproximadamente un pH de 6,5 y aislar el precipitado que contiene el anticuerpo; volver a suspender el precipitado que contiene el anticuerpo en un tampón que comprende  $\text{CaCl}_2$  a aproximadamente un pH de 8,5 y la eliminación de cualquier precipitado resultante para producir una solución que contiene anticuerpo; y combinar con etanol la solución que contiene anticuerpo en una solución madre de menos de aproximadamente 50 % durante un periodo de tiempo de aproximadamente 60 minutos (y/o a una velocidad de alimentación de aproximadamente 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  o menor) a aproximadamente un pH de 6,5 y aislar el precipitado que contiene anticuerpo purificado. El precipitado que contiene anticuerpo se aísla normalmente después de la última etapa (por ejemplo, etapa d) y puede lavarse (por ejemplo, con alcohol alifático). Ciertos métodos ejemplares se ilustran, por ejemplo, en las **Figs. 1, 10 y 17**. A continuación, también se proporcionan y se describen métodos para utilizar las proteínas y las composiciones que las contienen.

### Descripción detallada

Como se describe brevemente en líneas anteriores y con más detalle a continuación, la presente divulgación se refiere a métodos que resuelven problemas normalmente encontrados durante la purificación de proteínas. La comparación de las estrategias de purificación para los sobrenadantes A, B y C que contienen anticuerpo monoclonal mostró sorprendentemente que las estrategias de purificación presentadas en la presente memoria se pueden utilizar para separar selectivamente IgG de impurezas proteicas y de ADN directamente del sobrenadante de cultivo celular con una pureza y un rendimiento excepcionales.

Los métodos descritos en la presente memoria son generalmente adecuados para su uso en la purificación de proteína recombinante a partir de un sobrenadante de cultivo acelular (sin células). También se prefiere que el rendimiento de proteína, incluyendo anticuerpo, aislado del sobrenadante de cultivo acelular sea alto, siendo aproximadamente cualquiera de más de aproximadamente 30 % a aproximadamente 100 % (por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 77 %, 80 %, 85 %, 90 %, 90,5 %, 95 %, 95,8 %, 98,2 % o 99 %; por ejemplo, "rendimiento alto"). Sorprendentemente, los métodos descritos e ilustrados en la presente memoria proporcionan dicho rendimiento alto, directamente a partir del sobrenadante de cultivo acelular sin requerir una purificación inicial de los anticuerpos monoclonales en el mismo y/o el uso de aditivos tales como polietilenglicol. De este modo, en algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria proporcionan anticuerpos monoclonales con alto rendimiento directamente del sobrenadante de cultivo acelular (por ejemplo, sin purificación cromatográfica) utilizando una solución de precipitación que no incluye polietilenglicol. Normalmente, a largo plazo, los anticuerpos proporcionan características de conservación (por ejemplo, baja agregación y fragmentos) aceptables.

En algunas realizaciones, el sobrenadante del cultivo celular puede aclararse, por ejemplo, por centrifugación y/o filtración. En algunas realizaciones, puede ser necesario ajustar la concentración de fosfato del sobrenadante de cultivo celular a menos de aproximadamente 6 mM (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5,9 mM, tal como a aproximadamente < 5 mM, o aproximadamente de 1 a 5 mM). El sobrenadante también diluirse (por ejemplo, a 1:4, 1:5 o 1:10) utilizando una solución tal como, por ejemplo, agua. La concentración de proteína del sobrenadante (por ejemplo, clarificado y/o diluido, o no clarificado y/o diluido) se puede ajustar a un nivel apropiado (por ejemplo, a un "equilibrio de masas" apropiado).

En algunas realizaciones, una etapa inicial implica combinar un sobrenadante de cultivo celular (por ejemplo, clarificado y/o diluido, o no clarificado y/o diluido) que comprende la proteína (por ejemplo, anticuerpo) con una sal catiónica divalente en condiciones adecuadas para la precipitación de impurezas en el sobrenadante para producir un sobrenadante primario que comprende la proteína (por ejemplo, anticuerpo). Sin embargo, otras realizaciones pueden no incluir esta precipitación inicial utilizando una sal catiónica divalente (por ejemplo, la primera etapa es una precipitación con alcohol alifático). Por lo tanto, un sobrenadante primario puede "proceder de" o ser el resultado del tratamiento de un sobrenadante de cultivo celular y/o acelular en cualquiera de estas maneras (por ejemplo, tratamiento con o sin una sal de catión divalente). Sin embargo, en algunas realizaciones, e independientemente de si el sobrenadante primario se produce utilizando un catión divalente, normalmente se incluye una etapa de precipitación con catión divalente entre la primera y la segunda etapas de precipitación con alcohol alifático. Los cationes divalentes adecuados pueden incluir, por ejemplo,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ba}^{++}$  y  $\text{Sr}^{++}$ . Una cantidad suficiente (por ejemplo, de aproximadamente 25-500 mM, de aproximadamente 50-400 mM, de aproximadamente 150-250 mM, o de aproximadamente cualquiera de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 400, 425, 450, 475 o 500 mM (más particularmente de aproximadamente 150 mM)) del catión divalente puede añadirse después al sobrenadante. Una cantidad suficiente puede ser también la cantidad requerida para conseguir una conductividad particular (por ejemplo, de aproximadamente 10-30 mS/cm tal como de aproximadamente cualquiera de 10, 15, 20, 25, 30 (por ejemplo, 29), o 35 mS/cm). También se puede incluir un alcohol alifático a una cantidad apropiada (por ejemplo, de aproximadamente 1-40 % v/v, tal como de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 12,5 %, 15 %, 17,5 %, 20 %, 22,5 %, 25 %, 27,5 %, 30 %, 32,5 %, 35 %, 37,5 % o 40 % (v/v) (más particularmente de 5 % v/v o 30 % v/v)). Otras condiciones adecuadas para la precipitación pueden incluir, por ejemplo, un pH (por ejemplo, un pH de 7,0 a 9,0, tal como de 7,0, 7,25, 7,5, 7,75, 8,0, 8,25 u 8,5 (más particularmente de 7,5 u 8,5)) y una temperatura (por ejemplo, de 4 °C o de -10 °C) adecuados. Como ejemplos de condiciones pueden incluirse, por ejemplo, la inclusión de  $\text{CaCl}_2$  a una conductividad de 20 mS/cm; un pH de aproximadamente cualquiera de 6,5, 7,5 u 8,5; sin etanol, o incluyendo aproximadamente cualquiera de etanol al 5 %, 25 % o 39 % (v/v); y una temperatura de aproximadamente 4 °C o de aproximadamente -10 °C. Después de una cantidad de tiempo adecuado, puede formarse un precipitado y eliminarse, dejando un "sobrenadante primario" que comprende la proteína (por ejemplo, anticuerpo).

El sobrenadante primario puede después combinarse con un alcohol alifático en condiciones adecuadas para formar un precipitado que contiene anticuerpo, seguido por aislamiento del precipitado que contiene anticuerpo. El alcohol alifático puede ser, por ejemplo, etanol, metanol e isopropanol. La cantidad de alcohol alifático introducida puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 % v/v. Otras condiciones adecuadas para la precipitación del anticuerpo pueden incluir, por ejemplo, un pH (por ejemplo, de 6,5), una temperatura (por ejemplo, cualquiera de 4 °C, 0 °C, -5 °C, -10 °C, -15 °C, -20 °C, -25 °C, -30 °C o -40 °C) y una velocidad de adición a la reacción, adecuados. Por ejemplo, el alcohol alifático (por ejemplo, etanol) puede introducirse a partir de una solución madre de menos de aproximadamente 50 % durante un periodo de tiempo de aproximadamente 60 minutos (y/o una velocidad de alimentación de aproximadamente 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  o menor) a aproximadamente un pH de 6,5, y opcionalmente a aproximadamente 4 °C o -10 °C (la solución madre puede ajustarse previamente o no a la misma temperatura). También puede ser preferible una conductividad más baja de la solución. Después de una cantidad de tiempo adecuada, puede formarse y aislarse un precipitado que contenga la proteína (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) (por ejemplo, un precipitado inicial que contenga la proteína (por ejemplo, anticuerpo)).

El precipitado inicial que contiene anticuerpo se puede volver a suspender después en un tampón que comprenda una sal catiónica divalente (por ejemplo,  $\text{CaCl}_2$ ) en condiciones adecuadas para la precipitación de impurezas del mismo para producir una solución que contenga anticuerpo. Antes de introducir la sal catiónica divalente en la solución inicial que contiene anticuerpo, puede ser necesario ajustar la concentración de fosfato de la solución a menos de aproximadamente 6 mM (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5,9 mM, tal como menos de 0,5 mM o aproximadamente de 1 a 5 mM). Como cationes divalentes adecuados pueden incluirse, por ejemplo, los que comprenden calcio (por ejemplo,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ba}^{++}$ ,  $\text{Sr}^{++}$ ). Siempre que la concentración de fosfato de la solución que contiene anticuerpo sea apropiada (por ejemplo, 3-5 mM), una cantidad suficiente (por ejemplo,  $\text{CaCl}_2$  50-400 mM) de catión divalente puede añadirse después al sobrenadante. La cantidad suficiente de catión divalente puede determinarse con relación a la conductividad (por ejemplo, aproximadamente 29 mS/cm). Otras condiciones adecuadas para la precipitación pueden incluir, por ejemplo, un pH (por ejemplo, de 8,5) y una temperatura (por ejemplo, de 4 °C) adecuados. Después de una cantidad de tiempo adecuada, puede formarse un precipitado y eliminarse, dejando un sobrenadante secundario que comprenda la proteína (por ejemplo, anticuerpo).

El sobrenadante secundario puede combinarse después con un alcohol alifático en condiciones adecuadas para formar un precipitado que contiene anticuerpo purificado (por ejemplo, como se ha descrito anteriormente para la precipitación de anticuerpos del sobrenadante primario) y aislar el precipitado que contiene el anticuerpo purificado. El alcohol alifático puede ser, por ejemplo, etanol, metanol e isopropanol. La cantidad de alcohol alifático introducida puede ser, por ejemplo, de 15-40 % v/v (por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 % (v/v)). Otras condiciones adecuadas para la precipitación del anticuerpo pueden incluir, por ejemplo, un pH (por ejemplo, de 6,5) y una temperatura (por ejemplo, de -10 °C) adecuados. En este punto, también puede introducirse una sal, tal como NaCl. Después de una cantidad de tiempo adecuada, un precipitado que contiene la proteína (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) puede formarse y aislarse (por ejemplo, un precipitado que contiene la proteína (por ejemplo, anticuerpo) purificada).

Como ejemplos de combinaciones de condiciones que pueden ser adecuadas para el aislamiento de proteínas (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) de un sobrenadante de cultivo acelular, puede incluirse por tanto, por ejemplo:  $\text{CaCl}_2$  a 20 mS/cm, pH 8,5, etanol al 5 %, 4 °C, seguido de  $\text{CaCl}_2$  a 20 mS/cm, pH 8,5, etanol al 5 %, -10 °C (véase Ejemplos, estrategia A); 2)  $\text{CaCl}_2$  a 20 mS/cm, pH 7,5, etanol al 5 %, 4 °C, seguido de  $\text{CaCl}_2$  a 20 mS/cm, pH 7,5, etanol al 30 %, -10 °C (véase Ejemplos, estrategia B); 3)  $\text{CaCl}_2$  a 20 mS/cm, pH 8,5, 4 °C, seguido de  $\text{CaCl}_2$  a 20 mS/cm, pH 6,5, etanol al 25 %, -10 °C (véase Ejemplos, estrategia C); 4) NaCl a 10 mS/cm, pH 6,5, etanol al 25 %, -10 °C (véase Ejemplos, estrategia D); 5)  $\text{CaCl}_2$  a 20 mS/cm, pH 6,5, etanol al 5 %, -0,5 °C, seguido de  $\text{CaCl}_2$  a 70 mS/cm, pH 6,5, 10 % etanol, -3,4 °C, seguido de  $\text{CaCl}_2$  a 70 mS/cm, pH 6,5, 40 % etanol, -10 °C (véase Ejemplos, estrategia G); 6)  $\text{CaCl}_2$  a 28 mS/cm, pH 7,5, etanol al 5 %, 4 °C, seguido de  $\text{CaCl}_2$  a 28 mS/cm, pH 7,5, etanol al 5 %, -5,3 °C, seguido de  $\text{CaCl}_2$  a 28 mS/cm, pH 7,5, etanol al 40 %, -10 °C (véase Ejemplos, estrategia H); 7) NaCl a 20 mS/cm, pH 7,5, etanol al 40 %, -10 °C (véase Ejemplos, estrategia I); 8)  $\text{CaCl}_2$  a 10 mS/cm, pH 6,5, etanol al 10 %, -5,3 °C, seguido de  $\text{CaCl}_2$  a 40 mS/cm, pH 6,5, etanol al 20 %, -10 °C (véase Ejemplos, estrategia L); 9)  $\text{CaCl}_2$  a 10 mS/cm, pH 7,5, etanol al 5 %, -2,4 °C, seguido de  $\text{CaCl}_2$  a 20 mS/cm, pH 7,5, etanol al 40 %, -2,4 °C (véase Ejemplos, estrategia M); 10) NaCl a 40 mS/cm, pH 6,5, etanol al 15 %, -5,3 °C (véase Ejemplos, estrategia N). Otras condiciones también pueden ser adecuadas como entenderá un experto habitual en la materia.

Según se desee cualquiera de las etapas descritas anteriormente puede repetirse para conseguir un rendimiento y/o una pureza particular de la proteína (por ejemplo, anticuerpo). Por ejemplo, el precipitado que contiene anticuerpo purificado puede someterse a una o más precipitaciones adicionales en presencia de la sal catiónica divalente para eliminar impurezas adicionales, y una o más precipitaciones adicionales utilizando un alcohol alifático (para precipitar la proteína (por ejemplo, el anticuerpo)). Un experto habitual en la materia entenderá que pueden ser adecuadas variaciones a estas etapas para su uso.

Pueden ser cationes divalentes adecuados, por ejemplo,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ba}^{++}$  y/o  $\text{Sr}^{++}$ . Una cantidad suficiente de catión divalente puede determinarse por referencia a la conductividad donde, por ejemplo, una conductividad adecuada es de aproximadamente 10-30 mS/cm (por ejemplo, de aproximadamente cualquiera de 10, 15, 20, 25, 30 (por ejemplo, 29) o 35 mS/cm).

Los alcoholes alifáticos adecuados pueden incluir, por ejemplo, metanol, etanol, 1-propanol o isopropanol. Otros alcoholes también pueden ser adecuados como entenderá un experto habitual en la materia. Los alcoholes se pueden utilizar a cualquier temperatura apropiada. Normalmente, una temperatura apropiada de una solución madre del alcohol puede ser aproximadamente la misma que la temperatura de la reacción (por ejemplo, si la reacción de precipitación se produce a 4 °C, la solución madre de alcohol puede mantenerse a aproximadamente 4 °C).

En algunas realizaciones, el equipo y los reactivos utilizados en los métodos descritos en la presente memoria pueden estar acondicionados para un funcionamiento óptimo. Por ejemplo, los diversos componentes (por ejemplo, alcohol(es) alifático(s), tampón(es), jeringas, filtros, y/o similares, pueden calentarse o enfriarse a una temperatura adecuada antes de su uso. Una temperatura adecuada puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente -10 °C (por ejemplo, 4 °C o -10 °C). También pueden utilizarse otras temperaturas adecuadas tales como las que pueden determinar los expertos en la materia.

Las diversas etapas de los métodos descritos en la presente memoria descriptiva también pueden realizarse mientras se agita o se proporciona de otra manera movimiento a las mismas. Por ejemplo, la precipitación (para eliminar, por ejemplo, precipitados que contienen impurezas o anticuerpos) se puede aumentar agitando los reactivos de precipitación a una velocidad apropiada (por ejemplo, de aproximadamente 400 a 800 rpm, tal como a

5

También pueden ser adecuados una variedad de filtros y similares. Por ejemplo, puede utilizarse un "filtro plano" (por ejemplo, PVDF Durapore con un límite de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millex GV 0,2  $\mu\text{m}$ ) y la filtración es de 2,9  $\text{cm}^2$ ). Un "filtro de profundidad" que comprende múltiples capas (por ejemplo, cuatro capas) que comprende capas de microfibras de vidrio de diferentes límites (por ejemplo, 1  $\mu\text{m}$ , 0,7  $\mu\text{m}$  y/o 0,2  $\mu\text{m}$ ). Un filtro de profundidad apropiado puede ser un

10

Determinadas etapas posteriores a la filtración también pueden afectar a la pureza y/o al rendimiento. Por ejemplo, el precipitado que contiene anticuerpo purificado puede lavarse con una solución particular, lo cual puede ser ventajoso. Una etapa de lavado puede aumentar la pureza pero también puede dar como resultado un menor rendimiento. La conservación a temperatura ambiente también puede dar como resultado un menor rendimiento en comparación con la conservación a una temperatura más fría (por ejemplo, de 4  $^{\circ}\text{C}$  o de -20  $^{\circ}\text{C}$ ).

15

La disolución del precipitado que contiene anticuerpo purificado puede optimizarse también ajustando el flujo de la solución de disolución para que esté en la misma dirección que la que se utiliza para la filtración ("dirección de disolución en flujo") o en una dirección diferente que la que se utiliza para la filtración ("dirección de disolución contra flujo"). Por ejemplo, la dirección de disolución en flujo puede hacer que cualquier partícula no disuelta sea retenida en el filtro mientras que la dirección de disolución contra flujo puede hacer que las partículas no disueltas sean eliminadas con agua y recogidas con partículas disueltas. Estas estrategias pueden dar como resultado una pureza disminuida y/o un mayor rendimiento, o un aumento de la pureza y/o un rendimiento más bajo.

20

25

Los métodos descritos en la presente memoria proporcionan sorprendentemente el aislamiento de proteínas (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) de alta pureza con alto rendimiento. Algunas realizaciones proporcionan sorprendentemente un producto que comprende al menos aproximadamente cualquiera de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % del anticuerpo presente en el sobrenadante de cultivo acelular inicial (por ejemplo, un alto rendimiento). En algunas realizaciones, alto rendimiento puede significar que al menos aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % del anticuerpo presente en el sobrenadante de cultivo acelular inicial se recupere en el producto.

30

Los métodos descritos en la presente memoria comienzan normalmente con un sobrenadante de cultivo celular que contiene la proteína a aislar (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, contenido con el sobrenadante de cultivo celular de un hibridoma). Debe entenderse que también pueden utilizarse otros materiales de partida (por ejemplo, ascitis, una preparación semipurificada o purificada que contiene el anticuerpo). Estos métodos también pueden ser adecuados para el aislamiento de anticuerpos policlonales "purificados" de sueros y similares. Con respecto a un sobrenadante de cultivo acelular, este puede utilizarse directamente del cultivo, concentrarse y/o diluirse antes del procesamiento. El sobrenadante de cultivo acelular puede concentrarse por un factor, por ejemplo, de cualquiera de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 para proporcionar un volumen más bajo y, por lo tanto, una mayor concentración de proteínas (y otros componentes) (por ejemplo, siendo de 100 ml a 10 ml un factor de 10, o 10:1). El sobrenadante de cultivo acelular también puede diluirse por un factor, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. La concentración de proteína del sobrenadante acelular puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1-100 g/l, tal como cualquiera de aproximadamente 10 g/l, 25 g/l o 50 g/l. La concentración puede conseguirse utilizando cualquiera de las diversas técnicas ampliamente disponibles tales como, por ejemplo, centrifugación, concentración de sulfato de amonio, centrifugación y/o ultrafiltración de espín (por ejemplo, una Unidad de Filtro Centrífuga Ultra-15 de Amicon con membrana Ultracel-10), como entenderá un experto habitual en la materia. Un experto habitual en la materia conoce estos y otros materiales de partida adecuados.

35

40

45

El término "anticuerpo" o "anticuerpos", puede referirse a anticuerpos enteros o fragmentados en forma no purificada o parcialmente purificada (por ejemplo, sobrenadante de hibridoma, ascitis, antisueros policlonales) o en forma purificada. Los anticuerpos pueden ser de cualquier origen o forma adecuados incluyendo, por ejemplo, murino (por ejemplo, producidos por células de hibridoma murino), o expresarse como anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos y similares. Los anticuerpos pueden incluir, por ejemplo, IgM, IgG, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) e IgA (con las subclases IgA1 e IgA2) humanas. También pueden utilizarse y/o aislarse y/o purificarse derivados. Los derivados pueden incluir, por ejemplo, cualquier fragmento o versión modificada de un anticuerpo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo monocatenario Fab, Fab<sub>2</sub>, Fab', un Fv, un anticuerpo de un solo dominio, un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo trispecífico, un anticuerpo multivalente, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo quimérico canino-de ser humano, un anticuerpo quimérico

50

55

canino-de ratón, un anticuerpo que comprende un Fc canino, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, caninizado, un anticuerpo con CDR injertada, un anticuerpo de tiburón, un nanocuerpo (por ejemplo, un anticuerpo que consiste en un solo dominio variable monomérico), un anticuerpo de camélido (por ejemplo, anticuerpos de miembros de la familia *Camelidae*), un microcuerpo, un intracuerpo (por ejemplo, un anticuerpo intracelular), y/o un derivado de los mismos. Un anticuerpo "purificado" puede ser uno que esté separado al menos aproximadamente un 50 % de las proteínas con las que se encuentra inicialmente (por ejemplo, como parte de un sobrenadante de hibridoma o preparación de ascitis). Un anticuerpo purificado puede ser uno que esté separado al menos aproximadamente un 60 %, 75 %, 90 % o 95 % de las proteínas con las que se encuentra inicialmente (por ejemplo, en una muestra de cultivo celular). Los métodos de preparación y utilización de diversos tipos de anticuerpos son muy conocidos por los expertos en la materia y serían adecuados para poner en práctica la presente invención (véase, por ejemplo, Harlow, et al. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Harlow, et al., *Using Antibodies: A Laboratory Manual, Portable Protocol N.º 1*, 1998; Kohler and Milstein, *Nature*, 256: 495, 1975; Jones et al., *Nature*, 321: 522-525, 1986; Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-329, 1988; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596, 1992; Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536, 1988; Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 381, 1991; Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581, 1991; Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77, 1985; Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95, 1991; Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783, 1992; Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859, 1994; Morrison, *Nature* 368: 812-13, 1994; Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51, 1996; Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826, 1996; Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93, 1995; así como las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.816.567; 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016). En determinadas aplicaciones, los anticuerpos pueden estar contenidos en el sobrenadante de hibridoma (por ejemplo, un sobrenadante de cultivo celular acelular) o ascitis, por ejemplo, y pueden utilizarse directamente como tales o después de la concentración o dilución utilizando técnicas convencionales.

En otras aplicaciones, los anticuerpos pueden purificarse adicionalmente utilizando, por ejemplo, fraccionamiento salino y cromatografía de intercambio iónico, o cromatografía de afinidad, utilizando ligandos de Proteína A, Proteína G, Proteína A/G y/o Proteína L acoplados covalentemente a un soporte sólido, tal como perlas de agarosa, o combinaciones de estas técnicas antes del procesamiento, utilizando los métodos descritos en la presente memoria. Los anticuerpos se pueden conservar en cualquier formato adecuado, incluyendo una precipitación congelada (por ejemplo, a -20 °C o a -70 °C), en forma liofilizada, o en condiciones normales de refrigeración (por ejemplo, a 4 °C). Cuando se conservan en forma líquida, se puede utilizar un tampón adecuado tal como solución salina tamponada con Tris (TBS, por las siglas del inglés *Tris-Buffered Saline*) o solución salina tamponada con fosfato (PBS, por las siglas del inglés *Phosphate Buffered Saline*). Otros tipos de anticuerpos y derivados de los mismos también pueden ser adecuados como entenderá un experto en la materia.

Los anticuerpos monoclonales producidos utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria pueden formularse en composiciones, pudiendo ser algunas de ellas composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones descritas en la presente memoria pueden adoptar cualquier forma adecuada para su uso en investigación y/o administración a un hospedador (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano). Las formas adecuadas incluyen, por ejemplo, líquidos, cápsulas, emulsiones, gránulos, películas, implantes, soluciones líquidas, pastillas para chupar, partículas múltiples, sobres, sólidos, comprimidos, trociscos, gránulos, polvos y/o suspensiones. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y los alcoholes polietilénicos, con o sin adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Las formas en cápsula pueden formarse de gelatina (por ejemplo, dura o blanda). Cualquiera de dichas composiciones puede incluir, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y cargas inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, almidón de maíz y/o similares. Las formas en comprimido pueden incluir, por ejemplo, excipientes y/u otros agentes tales como lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, celulosa microcristalina, goma arábiga, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, disgregantes (por ejemplo, croscarmelosa sódica), talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de cinc, ácido esteárico, colorantes, diluyentes, agentes tamponantes, disgregantes, humectantes, conservantes y/o agentes aromatizantes. También se pueden utilizar formas de pastillas para chupar, normalmente con una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga, emulsiones, geles y similares. Las composiciones también pueden prepararse en forma liofilizada. Otras formas también pueden ser adecuadas como entenderá un experto en la materia.

Las composiciones farmacéuticas pueden adoptar cualquiera de las formas descritas anteriormente, o las ya conocidas en la técnica. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse utilizando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables antes de su uso en investigación y/o administración a un hospedador (por ejemplo, un animal, tal como un ser humano). Un vehículo farmacéuticamente aceptable es un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable, por ejemplo, el material puede utilizarse en investigación y/o administrarse a un sujeto, sin causar ningún efecto biológico indeseable o interaccionar de manera perjudicial con cualquiera de otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido y/o reacción en la que se utiliza el mismo. Naturalmente, el vehículo se seleccionará para minimizar cualquier degradación del agente activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como sabe bien el experto en la materia. Los vehículos farmacéuticos adecuados y sus formulaciones se describen por ejemplo, en *Remington's: The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª edición, David B. Troy, ed., Lippicott Williams & Wilkins (2005). Normalmente, en la

formulación se utiliza una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable, para hacer que la formulación sea isotónica. Como ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables se incluyen, pero sin limitación, agua estéril, solución salina, soluciones tamponadas como solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es generalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 o de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen polipéptidos o fragmentos de los mismos. Las matrices pueden estar en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Será obvio para los expertos en la materia que determinados vehículos pueden ser más preferibles dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y de la concentración de la composición que se va a administrar. También se proporcionan métodos para tratar la enfermedad administrando la composición (por ejemplo, como una composición farmacéutica) a un hospedador que necesite tratamiento. Las vías de administración adecuadas incluyen, por ejemplo, la vía oral, bucal, rectal, transmucosa, tópica, transdérmica, intradérmica, intestinal y/o parenteral. Otras vías de administración y/o formas de las composiciones descritas en la presente memoria también pueden ser adecuadas como entenderán los expertos en la materia.

Las composiciones descritas en la presente memoria pueden utilizarse para tratar varias enfermedades, incluyendo, pero sin limitación, cáncer y afecciones no cancerosas. Las afecciones relacionadas con cáncer y/o con crecimiento celular que pueden tratarse incluyen, por ejemplo, tumores benignos, tumores malignos, verrugas, pólipos y similares. Como ejemplos de cánceres que pueden tratarse utilizando las composiciones descritas en la presente memoria pueden incluirse, pero sin limitación, cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, linfoma (por ejemplo, de Burkitt, no Hodgkiniano), carcinoma endometrial, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, sin poliposis, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata y similares. También pueden tratarse otras enfermedades asociadas con cáncer y/o con crecimiento celular como entenderá un experto en la materia.

Enfermedades típicas, distintas de cáncer, que también pueden tratarse con las composiciones descritas en la presente memoria pueden incluir, por ejemplo, trastornos gastrointestinales, tales como diarrea crónica, enfermedades del intestino delgado (por ejemplo, enteritis, incluyendo pero sin limitación, duodenitis, yeyunitis, ileítis), úlcera péptica/duodenal (por ejemplo, úlcera de Curling) y absorción insuficiente (por ejemplo, enfermedad celiaca, esprúe tropical, síndrome del asa ciega, enfermedad de Whipple, síndrome del intestino corto, esteatorrea, enfermedad de Milroy), enfermedades del intestino grueso (por ejemplo, apendicitis, colitis (por ejemplo, pseudomembranosa, ulcerativa, isquémica, microscópica, colagenosa, linfocítica), enfermedad colónica funcional (SII, pseudoobstrucción intestinal/síndrome de Ogilvie), megacolon/megacolon tóxico, diverticulitis/diverticulosis), enterocolitis (por ejemplo, necrotizante), enfermedad intestinal inflamatoria ("EII"), enfermedad de Crohn, diarrea (por ejemplo, infecciosa, crónica), angina abdominal, isquemia mesentérica, angiodisplasia, proctitis (por ejemplo, proctitis por radiación), proctalgia fugaz, fisura anal/fístula anal, absceso anal, artritis y similares. También pueden tratarse otras enfermedades no cancerosas o relacionadas con el crecimiento celular como entenderá un experto en la materia.

Los anticuerpos monoclonales producidos como se describe en la presente memoria, y/o las composiciones que comprenden los mismos, pueden utilizarse en investigación para detectar proteínas y/o función/expresión de ácido nucleico en células, tejidos y similares *in vivo* y/o *in vitro*. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden utilizarse para teñir células para identificar las que expresan una proteína particular. Los anticuerpos monoclonales también pueden conjugarse con un marcador detectable y/o con un resto citotóxico. También se contemplan otros usos de los anticuerpos monoclonales producidos como se describe en la presente memoria, como podrá verificar fácilmente un experto en la materia.

También se proporcionan kits que comprenden los reactivos necesarios para aislar una proteína (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) de un sobrenadante de cultivo celular (por ejemplo, un sobrenadante de cultivo acelular). Un ejemplo de un kit puede contener una o más sales, soluciones y/o tampones (por ejemplo, una o más sales catiónicas divalentes y/o uno o más alcoholes alifáticos). El kit también puede incluir diversos tipos de aparatos (por ejemplo, filtros o similares) que pueden ser necesarios para llevar a cabo los métodos descritos en la presente memoria. El kit también puede incluir controles positivos y/o negativos que pueden utilizarse para confirmar que el método está funcionando tal y como se desea. También se pueden incluir instrucciones de uso. En algunas realizaciones, los kits comprenden uno o más recipientes que comprenden una composición descrita en la presente memoria, o mezclas de la misma, e instrucciones para su uso *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, el kit puede incluir un recipiente que comprenda sales, soluciones y/o tampones, y/o las composiciones descritas en la presente memoria junto con instrucciones para su uso. Las composiciones que comprenden las proteínas aisladas utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para introducir las mismas en una célula *in vitro*, tal como añadiendo la composición a un cultivo celular a granel o a células individuales y/o una composición de la proteína e instrucciones para administrarlo a un animal (tal como un ser humano) para prevenir o tratar una patología. También se proporcionan otras realizaciones de kits como entenderá un experto habitual en la materia.

En la presente memoria los intervalos pueden expresarse desde aproximadamente un valor particular, y/o hasta aproximadamente otro valor particular. Cuando se expresa dicho intervalo, otro aspecto incluye desde el valor



particular y/o al otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, utilizando delante las expresiones alrededor de o aproximadamente, se entenderá que el valor particular forma otro aspecto. Se comprenderá además que ambos límites de cada uno de los intervalos son significativos en relación con el otro límite, e independientemente del otro límite. Se pretende que los intervalos (por ejemplo, 90-100 %) incluyan el intervalo por sí mismo, así como cada valor independiente dentro del intervalo, como si cada valor se indicase individualmente.

Debe observarse que, tal y como se utiliza la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un(o)”, “una” y “el”, “lo”, “la”, incluyen referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. De este modo, por ejemplo, la referencia a un fragmento puede incluir mezclas de fragmentos y la referencia a un vehículo o adyuvante farmacéutico puede incluir mezclas de dos o más de dichos vehículos o adyuvantes. Las expresiones “alrededor de”, “aproximadamente”, y similares, cuando van delante de una lista de valores numéricos o intervalo, se refieren a cada valor individual en la lista o intervalo independientemente como si cada valor individual en la lista o intervalo fuera precedido inmediatamente por esa expresión. Las expresiones significan que los valores a los que se refieren son exactamente cercanos o similares a los mismos. Como se usa en la presente memoria, un sujeto o un hospedador significa que se trata de un individuo. El sujeto puede incluir animales domesticados, tales como gatos y perros, ganado (por ejemplo, vacuno, equino, porcino, ovino y caprino), animales de laboratorio (por ejemplo, ratones, conejos, ratas, cobayas) y pájaros. En un aspecto, el sujeto es un mamífero, tal como un primate o un ser humano. Opcional u opcionalmente significa que el suceso o la circunstancia que se describe posteriormente puede ocurrir o no, y que la descripción incluye casos en los que se produce el suceso o la circunstancia y casos en los que no se produce. Por ejemplo, la frase opcionalmente la composición puede comprender una combinación significa que la composición puede comprender una combinación de diferentes moléculas o puede no incluir una combinación de tal manera que la descripción incluye tanto la combinación como la ausencia de la combinación (es decir, miembros individuales de la combinación).

Todas las referencias citadas en la presente memoria se incorporan en su totalidad por referencia en la presente divulgación. A partir de los siguientes ejemplos, proporcionados a modo de ilustración, se tendrá una mejor comprensión de la presente invención y de sus muchas ventajas.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### A. Materiales y Métodos

##### 30 1. Identificación de la recuperación de precipitación a 4 °C

Para medir la pureza y el rendimiento del anticuerpo monoclonal, el sobrenadante que contenía anticuerpo monoclonal se diluyó a 1:5 con HQ-H<sub>2</sub>O antes de añadir etanol al 96 % (v/v) a una concentración final de 33 % (v/v). La solución se incubó durante una noche en una cámara fría (4 °C) con ligera agitación (400 rpm). Se recogieron alícuotas de 10 ml y se filtraron utilizando un filtro plano (Millex GV, Sartorius, Bedford, USA) o un filtro de profundidad (GD/X, Whatman, Little Chalfont, UK). El filtro plano utiliza una membrana de PVDF Durapore con un límite de 0,22 µm mientras que el filtro de profundidad utiliza cuatro capas de material de filtración diferente (capa 1+2: microfibras de vidrio de 10 a 1 µm, capa 3: prefiltro de microfibras de vidrio de 0,7 µm, capa 4: PDVDF 0,2 µm). Después de un plan de diseño factorial, los precipitados se lavaron después o no se lavaron, se disolvieron en tampón de histidina (histidina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 6,0) inmediatamente o después de un espacio de tiempo y la dirección de flujo para disolver el precipitado era idéntica u opuesta a la dirección de flujo de la recogida del precipitado. Todos los precipitados disueltos se analizaron por cromatografía analítica de proteína A. La pureza se calculó como el área de pico de IgG dividido entre la suma de las áreas de flujo continuo y el pico de IgG.

##### 2. Evaluación de las estrategias de purificación del sobrenadante A y B que contiene anticuerpo monoclonal.

El sobrenadante respectivo se transfirió a los recipientes de un reactor Integrity 10 (Thermo Fisher Scientific, Rochford, Reino Unido) y se equilibró a 20 °C (~temperatura ambiente). Para todos los experimentos, los volúmenes de partida se seleccionaron de manera que la última etapa de precipitación comenzaba con 10 ml de sobrenadante de cultivo celular ajustado. Se utilizaron tres metodologías diferentes: (1) precipitación inicial de las impurezas, tales como impurezas de ADN y proteicas; (2) precipitación selectiva de IgG y (3) precipitación del sobrenadante de cultivo celular clarificado o del sobrenadante de cultivo celular clarificado solo diluido. Para la precipitación inicial de impurezas pueden ser necesarias dos o tres etapas de precipitación. Las primeras etapas de precipitación (1 y/o 2) están destinadas a la eliminación de las impurezas por precipitación. En este caso, los precipitados se descartan y el sobrenadante de precipitación restante se utiliza para proseguir. El precipitado solo se recogió utilizando filtros de profundidad (GD/X, Whatman) después de la etapa final. A continuación se lavó utilizando una solución de etanol templada de concentración respectiva y se disolvió en tampón de histidina (histidina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 6,0). Para la precipitación selectiva de IgG, puede ser necesario solamente una etapa de precipitación. Después, el

precipitado puede recogerse, lavarse y disolverse. Para la precipitación de IgG del sobrenadante de cultivo celular clarificado y del sobrenadante de cultivo celular diluido (1:4 con HQ-H<sub>2</sub>O) no se requiere realizar ningún ajuste salvo controlar la temperatura. Nuevamente, se recogen los precipitados, se lavan y se disuelven como se ha descrito anteriormente. Los ajustes se realizaron de la siguiente manera: (a) ajuste del pH utilizando HCl o NaOH; (b) ajuste de la conductividad utilizando NaCl o CaCl<sub>2</sub> saturado; (c) control, y si se requiere, ajuste adicional del pH; (d) ajuste simultáneo de temperatura y adición de etanol. El etanol se preenfrió a -10 °C y se añadió a 2-4 µl/min. Después de la adición de etanol, la suspensión se incubó durante al menos dos horas. Para cada etapa de precipitación, se realizaron los ajustes necesarios en esta secuencia dada. Todas las manipulaciones se realizaron a temperatura ambiente a menos que se indique otra cosa. Las jeringas y los filtros también se conservaron a temperatura ambiente a menos que se indique otra cosa. Los precipitados disueltos se analizaron con respecto a la concentración de IgG (cromatografía analítica de proteína A), concentración de impurezas proteicas (ensayo de Bradford, excluyendo IgG) y concentración de ADN (ensayo de Picogreen). Adicionalmente, los precipitados disueltos se analizaron mediante SEC. Identificación de recuperación de precipitación a -10 °C. Alícuotas de 5 ml de sobrenadante de cultivo celular de anticuerpo monoclonal A se transfirieron a los recipientes del reactor Integrity 10 (Thermo Fisher Scientific) y se templaron a 4 °C. Después de adición de etanol al 96 % (v/v) a una concentración final del 40 % (v/v) durante 30 minutos mientras que la temperatura se reducía linealmente a -10 °C. La suspensión se mezcló después a 400 rpm o a 1000 rpm y después de dos horas se recogió por filtración utilizando un filtro de profundidad (GD/X, Whatman). Los filtros y las jeringas utilizados se templaron a temperatura ambiente, 4 °C en el refrigerador del laboratorio o a una temperatura de ~ -20 °C en el congelador del laboratorio. Los precipitados se lavaron utilizando una solución de etanol templado (-10 °C, etanol al 40 % (v/v)) y después se disolvieron en tampón de histidina 10 ml (histidina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 6,0). Todas las manipulaciones se realizaron a temperatura ambiente a menos que se indique otra cosa. Los sobrenadantes de la precipitación, la solución de lavado y los precipitados disueltos se recogieron y se analizaron mediante cromatografía analítica de proteína A. La pureza respectiva se calculó de nuevo como área de pico de IgG dividido entre la suma de las áreas de flujo continuo y el pico de IgG. A continuación se proporciona una descripción detallada de la configuración experimental. Todos los experimentos se realizaron por triplicado a menos que se indique otra cosa.

### 3. Perfil de elución del precipitado disuelto - Recuperación y pureza

Se utilizó la misma configuración experimental que para la identificación de recuperación por precipitación a -10 °C para alícuotas de 5 ml de sobrenadante de cultivo celular que contenía anticuerpo monoclonal. El precipitado obtenido no se lavó. El precipitado disuelto se recogió en alícuotas de 1 ml y cada alícuota se analizó por cromatografía analítica de proteína A. La pureza respectiva se calculó de nuevo como área de pico de IgG dividido entre la suma de las áreas de flujo continuo y del pico de IgG.

### 4. Comparación de diferentes alcoholes para la precipitación

Los alcoholes utilizados fueron metanol (Methanol LCMS Chromasolv, Fluka), etanol (Etanol 96 % Emprove exp, Merck), isopropanol (Isoropropanol LiChrosolv, Merck), acetona (Aceton p.a., Merck) o 1,2-propandiol (Acros Organics). Alícuotas de 10 ml del sobrenadante C de cultivo celular se transfirieron a los recipientes de un reactor Integrity 10 (Thermo Fisher Scientific) y se templaron a 4 °C. Durante la adición del respectivo alcohol a una concentración final de 10 % (v/v) o de 30 % (v/v) durante 1 h, la temperatura se redujo linealmente a 0 °C o a -5 °C. No se observó precipitación de acetona o 1,2-propandiol. Los precipitados se recogieron con filtros de profundidad (GD/X, Whatman) y se disolvieron sin lavado previo utilizando 10 ml de tampón de histidina (histidina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 6,0). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La concentración de IgG en el sobrenadante de precipitación y el análisis de la composición de los precipitados disueltos se realizaron utilizando SEC (Bio-SEC3, Agilent).

## B. Aislamiento de proteínas

### 45 1. Influencia del tipo de filtro y condiciones sobre la recuperación y pureza después de precipitación a 4 °C.

Se evaluaron también parámetros adicionales de recogida y disolución de precipitados (Tabla 1). Todos los experimentos se realizaron con el sobrenadante que contenía anticuerpo monoclonal en cultivo clarificado (por ejemplo, sobrenadante B). El "filtro plano" corresponde al Millex GV 0,22 µm. Este filtro utiliza una membrana de PVDF Durapore con un límite de 0,22 µm y un área de filtración de 3,9 cm<sup>2</sup>. El "filtro de profundidad" corresponde al GD/X 0,2 µm de Whatman. Su material de filtración consta de 4 capas: la capa 1 + capa 2 consta de microfibras de vidrio con un límite de 10 a 1 µm; la capa 3 consta de una microfibras de vidrio con un límite de 0,7 µm; la capa 4 consta de una membrana de PVDF con un límite de 0,2 µm. La ventaja del "filtro de profundidad" es facilitar la filtrabilidad de las partículas precipitadas (1-30 µm). En comparación con un "filtro plano", se pueden filtrar volúmenes más grandes de suspensión de precipitación antes de que se observe obstrucción de la membrana. Sin embargo, la disolución del precipitado recogido no es tan fácil. El mayor volumen de retención (1 ml o 250 µl con purga de aire) en comparación con el volumen de retención del "filtro plano" (100 µl) da como resultado una dilución de la muestra e incluso una recuperación incompleta. Adicionalmente, otras etapas posteriores a la filtración, tales como el lavado o el secado del sedimento, pueden tener un efecto sobre la pureza y/o el rendimiento. El lavado del

precipitado utilizando una solución precipitante pura de concentración y temperatura correctas, puede ayudar a aumentar la pureza. Sin embargo, el lavado supone un esfuerzo adicional sobre la partícula y puede dar lugar a un lavado inespecífico, en particular si las partículas son pequeñas. El impacto del secado es de interés para evaluar si el precipitado podría guardarse en el filtro de la jeringa o si debería disolverse y recogerse inmediatamente.

- 5 La dirección del flujo durante la disolución del sedimento también puede tener un efecto sobre la eficacia de la disolución. Por lo tanto, el sedimento se disolvió utilizando la misma dirección de flujo que para la filtración (“dirección de disolución en flujo”) o una dirección de flujo contraria al flujo de la filtración (“dirección de disolución contra flujo”). Las partículas no disueltas se retuvieron en el filtro utilizando “dirección de disolución en flujo”, pero se lavaron y recogieron junto con las partículas disueltas utilizando la dirección de disolución contra flujo. Esto puede dar como resultado una pureza disminuida pero también un rendimiento más alto. Utilizando los factores indicados en la **Tabla 1** se estableció un plan de diseño de cuatro factores, similar a los planes de diseño descritos anteriormente:

**Tabla 1**

Factor	Descripción	Niveles
A	Tipo de filtro	“-1” o “filtro plano” “+1 o “filtro de profundidad”
B	Dirección en flujo de la disolución del precipitado	“-1” o “dirección en flujo” +1 o “dirección contra flujo”
C	Lavado del precipitado en el filtro	“-1” o “con lavado” “+1” o “sin lavado”
D	Secado del precipitado en el filtro	“-1” o “con secado” “+1” o “sin secado”

- 15 El sobrenadante del cultivo celular clarificado con anticuerpo monoclonal se diluyó a 1:5 con agua-OI (osmosis inversa y etanol añadido a una concentración final de ~33 % (v/v) y la suspensión se incubó durante la noche a 4 °C con agitación suave (400 rpm). Las muestras tomadas se procesaron después como se indica en la **Tabla 2**. El rendimiento de la precipitación fue bajo (40-50 %) debido a la baja concentración de anticuerpo en el material de partida.

20

**Tabla 2**

Proceso n.º	Término	A	B	C	D
1	0	-1 “filtro plano”	-1 “en flujo”	-1 “con lavado”	-1 “con secado”
2	A	+1 “filtro de profundidad”	-1 “en flujo”	-1 “con lavado”	-1 “con secado”
3	B	-1 “filtro plano”	+1 “contra flujo”	-1 “con lavado”	-1 “con secado”
4	C	+1 “filtro de profundidad”	+1 “contra flujo”	-1 “con lavado”	-1 “con secado”
5	D	-1 “filtro plano”	-1 “en flujo”	+1 “sin lavado”	-1 “con secado”
6	AB	+1 “filtro de profundidad”	-1 “en flujo”	+1 “sin lavado”	-1 “con secado”
7	AC	-1 “filtro plano”	+1 “contra flujo”	+1 “sin lavado”	-1 “con secado”
8	AD	+1 “filtro de profundidad”	+1 “contra flujo”	+1 “sin lavado”	-1 “con secado”
9	BC	-1 “filtro plano”	-1 “en flujo”	-1 “con lavado”	+1 “sin secado”
10	BD	+1 “filtro de profundidad”	-1 “en flujo”	-1 “con lavado”	+1 “sin secado”
11	CD	-1 “filtro plano”	+1 “contraflujo”	-1 “con lavado”	+1 “sin secado”
12	ABC	+1 “filtro de profundidad”	+1 “contraflujo”	-1 “con lavado”	+1 “sin secado”
13	ABD	-1 “filtro plano”	-1 “en flujo”	+1 “sin lavado”	+1 “sin secado”
14	ACD	+1 “filtro de profundidad”	-1 “en flujo”	+1 “sin lavado”	+1 “sin secado”
15	BCD	-1 “filtro plano”	+1 “contraflujo”	+1 “sin lavado”	+1 “sin secado”
16	ABCD	+1 “filtro de profundidad”	+1 “contraflujo”	+1 “sin lavado”	+1 “sin secado”

La concentración de IgG de todas las muestras se analizó mediante cromatografía analítica de proteína A. La pureza se calculó utilizando la relación del área del pico de flujo continuo con respecto al área del pico de IgG determinado por cromatografía analítica de proteína A. Esto sirvió como una aproximación suficiente y rápida cuando solamente se necesitaban evaluar diferencias dentro de una muestra. Se calculó el efecto sobre el rendimiento, el equilibrio de masa y la pureza para aislar los factores principales y de interacción con impacto significativo (**Tabla 3**). Como se muestra en la misma, el factor D, así como los factores de interacción AB y CD, tuvieron un impacto significativo sobre el rendimiento y el equilibrio de masa, mientras que para la pureza solo el factor C tuvo un impacto significativo.

**Tabla 3**

Término del modelo	Porcentaje de rendimiento	Porcentaje de equilibrio de masa	Porcentaje de pureza
A (tipo de filtro)	1,9 %	1,8 %	0,2 %
B (dirección de flujo)	3,0 %	3,0 %	0,8 %
C (con lavado)	0,1 %	0,2 %	<b>87,5 %</b>
D (con secado)	<b>24,0 %</b>	<b>24,1 %</b>	2,3 %
AB	<b>16,5 %</b>	<b>16,6 %</b>	1,5 %
AC	1,0 %	1,0 %	0,9 %
AD	0,0 %	0,0 %	0,1 %
BC	1,0 %	1,0 %	0,0 %
BD	1,4 %	1,4 %	0,1 %
CD	<b>21,7 %</b>	<b>21,8 %</b>	3,3 %
ABC	0,6 %	0,5 %	0,0 %
ABD	0,8 %	0,7 %	0,0 %
ACD	0,2 %	0,2 %	0,0 %
BCD	0,4 %	0,4 %	0,0 %
ABCD	0,8 %	0,8 %	0,0 %

10

En las **Figs. 2 y 3** se proporcionan las gráficas de los factores principales y de los factores de interacción seleccionados. La **Fig. 2** ilustra las gráficas principal y de interacción con el equilibrio de masa en función de la respuesta. En promedio, el equilibrio de masa fue de aproximadamente  $86 \% \pm 6 \%$ . Teniendo en cuenta la escala más bien pequeña (10 ml) de las reacciones, esto no era inesperado. El tipo de filtro y la dirección de flujo también mostraron un ligero impacto. Esto se correlacionaba bien con el pequeño porcentaje observado (**Tabla 3**). El lavado del precipitado no tuvo efecto sobre el equilibrio de masa. El impacto más significativo entre los factores principales es el factor de "secado del precipitado en el filtro" ("D"). Se determinó que la conservación del precipitado en el filtro durante periodos más largos (= "secado") puede no ser aconsejable, ya que puede conducir a una disminución en el rendimiento (solo del 83 % en comparación con el 89 %).

15

La selección de la dirección de flujo de la disolución (B) del sedimento debe seleccionarse dependiendo del filtro (A) utilizado (**Fig. 2**). Mientras que el filtro plano produjo resultados solo ligeramente mejores cuando funcionaba a contra flujo, el filtro de profundidad normalmente solo es aplicable si el sedimento se disuelve en la dirección de flujo. Esto se debió probablemente a la diferencia en su estructura. El filtro plano es un filtro simétrico mientras que el filtro de profundidad es un filtro asimétrico. Además, la evaluación de los factores de interacción mostró que el secado del precipitado cuando no se lavaba conducía a una disminución significativa del equilibrio de masa (**Fig. 2**), mientras que para el sedimento lavado no se encontró influencia del secado. El equilibrio de masa para el sedimento no lavado es normalmente más alto que el del sedimento lavado. Como el equilibrio de masa y el rendimiento están correlacionados, las mismas observaciones que para el equilibrio de masa son también verdaderas para el rendimiento (**Fig. 3**). Como se mencionó anteriormente, el rendimiento puede ser bajo (40-50 %) debido a la baja concentración del anticuerpo en el sobrenadante del cultivo celular diluido. El precipitado disuelto, lavado, tiene una pureza significativamente más alta ( $80 \% \pm 2 \%$ ) que el precipitado disuelto, no lavado ( $65 \% \pm 3 \%$ ).

25

30

Basándose en estos datos, se ensayó un filtro de profundidad para la filtración ya que permite una rápida recogida del precipitado. A esta escala, es aceptable la dilución durante la disolución del sedimento debido al efecto de eliminación con lavado del filtro de profundidad. Como se ha indicado anteriormente, el filtro de profundidad es un filtro asimétrico y en todo el experimento es necesario utilizar la misma dirección de flujo. A pesar de la pérdida de material, el efecto del lavado sobre la pureza es significativo (pureza de  $\sim 20 \%$  más alta). Una demora en la disolución del precipitado produce una pérdida de material y por lo tanto también se evitará. Normalmente, cualquier precipitado recuperado debería disolverse después del lavado.

35

## 2. Comparación de diferentes alcoholes para la precipitación

También se ensayó el uso de diversos alcoholes para precipitar anticuerpos de sobrenadantes de cultivo celular. En la **Tabla 4** se muestra una lista de alcoholes ensayados en estos experimentos.

**Tabla 4**

Alcohol	Propiedades	Comentarios
Metanol	<i>soluble en agua</i> <i>punto de fusión: -98 °C</i>	Tóxico. Experimento de precipitación.
Etanol	<i>soluble en agua</i> <i>punto de fusión: -114 °C</i>	Experimento de precipitación.
1-propanol	<i>soluble en agua</i> <i>punto de fusión: -127 °C</i>	No disponible. Experimento de precipitación suspendido.
Isopropanol	<i>soluble en agua</i> <i>punto de fusión: -88 °C</i>	Experimento de precipitación.
1-Butanol	<i>soluble en agua a ~11 % (v/v)</i> <i>punto de fusión: -89 °C</i>	No miscible con agua.
Isobutanol	<i>soluble en agua a ~11 % (v/v)</i> <i>punto de fusión: -108 °C</i>	No miscible con agua.
Butanol secundario	<i>soluble en agua ~11 % (v/v)</i> <i>punto de fusión: -114 °C</i>	No miscible con agua.
Butanol terciario	<i>soluble en agua</i> <i>punto de fusión: 26 °C</i>	Punto de fusión demasiado bajo.
1,2 Propandiol	<i>soluble en agua</i> <i>punto de fusión: -68 °C</i>	No se observa precipitación.
Acetona	<i>soluble en agua</i> <i>punto de fusión: -95 °C</i>	No se observa precipitación.

5 Se sabe que el metanol, similar al etanol, presenta un punto de fusión bajo y una buena solubilidad en agua. También se ensayó el etanol. El 1-propanol también puede ser adecuado pero no se ensayó en estos experimentos. Los butanoles, con la excepción del butanol terciario, solo son solubles en agua a una concentración de aproximadamente 11 % (v/v). El butanol terciario es soluble en agua y tiene un punto de fusión sólo de 26 °C (dificultando la manipulación a temperatura ambiente). También se ensayaron la acetona y el 1,2-propandiol (ambos solubles en agua y con puntos de fusión relativamente bajos). Sin embargo, no se observó precipitación utilizando precipitación con acetona o 1,2-propandiol en las condiciones ensayadas (5-30 % (v/v) a 0 °C o a -5 °C) (**Fig. 27**).

10 La **Figura 28** ilustra las curvas de solubilidad del anticuerpo monoclonal después de la precipitación utilizando metanol, etanol o isopropanol a 0 °C o a -5 °C. A -5 °C, la solubilidad del anticuerpo monoclonal A era muy similar a la precipitación a 0 °C, aunque se observaron diferencias en la pendiente y en la intersección. Se presentan tres puntos de datos para cada alcohol a 0 °C. Los datos sugieren que el comportamiento de los diferentes alcoholes es, al menos a bajas temperaturas, similar y que el etanol podría reemplazarse bien por metanol o por isopropanol.

## 3. Optimización de precipitación con CaCl<sub>2</sub>

15 Para los sobrenadantes A y C de cultivo celular que contenía anticuerpo monoclonal, se ensayó la precipitación con CaCl<sub>2</sub> con diversas concentraciones de CaCl<sub>2</sub> (5-100 mM) y una posterior precipitación con etanol (25 % (v/v), a -10 °C). Como el sobrenadante A tiene una mayor concentración de fosfato (~3,1 mM) que el sobrenadante C (0,2 mM), se esperaba que la precipitación con CaCl<sub>2</sub> fuese más pronunciada para el sobrenadante A. La precipitación con CaCl<sub>2</sub> se realizó a temperatura ambiente y a un pH de 8,5 (ajustado utilizando NaOH). El precipitado de CaCl<sub>2</sub> se eliminó del sobrenadante por centrifugación (4000 g, 15 min) y el pH del sobrenadante se llevó a un pH de 6,5 utilizando HCl. Como se muestra en la **Fig. 29**, la concentración de impurezas (HCP) del sobrenadante A es menor que la del sobrenadante C, lo que está en consonancia con la concentración inicial de HCP en los sobrenadantes (sobrenadante A: 54212 ppm; sobrenadante C; 180099 ppm). La **Fig. 29** también muestra que la concentración de CaCl<sub>2</sub> en la primera etapa tiene una influencia significativa sobre el nivel de HCP final para el sobrenadante A y una escasa influencia para el sobrenadante C. La concentración de IgG es casi independiente de la concentración de CaCl<sub>2</sub> utilizada en la primera etapa para los dos sobrenadantes ensayados. Puede encontrarse una desviación típica mayor a concentraciones de CaCl<sub>2</sub> más bajas para el sobrenadante A.

También se ensayaron concentraciones de CaCl<sub>2</sub> más altas (500 mM, **Fig. 30**). Como se muestra en la Fig. 2-11B, la concentración de impurezas (HCP) disminuye adicionalmente para el sobrenadante A a una concentración de CaCl<sub>2</sub> de 250 mM, mientras que permanece casi constante para el sobrenadante C. El aumento de la concentración de HCP para el sobrenadante a una concentración de CaCl<sub>2</sub> de 500 mM, se debe a una pérdida significativa de IgG. Por lo tanto, se determinó que la concentración óptima de CaCl<sub>2</sub> para eliminar la concentración de HCP era de aproximadamente 150 -250 mM.

Como se muestra más adelante, la concentración de fosfato puede mejorar el aislamiento de anticuerpos monoclonales del sobrenadante del cultivo celular. La concentración de fosfato del sobrenadante A es mayor que la del sobrenadante C, lo que podría dar como resultado una influencia más fuerte de CaCl<sub>2</sub> sobre la eliminación de HCP. Por lo tanto se ensayó el aislamiento de anticuerpo monoclonal del sobrenadante C por precipitación con CaCl<sub>2</sub> y precipitación con etanol frío (CEP, *cold ethanol precipitation*) en presencia de concentraciones elevadas de fosfato. Al sobrenadante se le añadió fosfato a una concentración final de 4,0 mM, y después se realizó la precipitación con CaCl<sub>2</sub> y CEP. Los resultados se compararon con el sobrenadante que contenía la concentración de fosfato "original" de aproximadamente 0,2 mM de fosfato. Como se muestra en la **Fig. 31**, la adición de fosfato no cambió significativamente los resultados.

Para determinar si el efecto sobre la reducción de HCP se debía a la precipitación con CaCl<sub>2</sub>-fosfato o a la alta conductividad ocasionada por CaCl<sub>2</sub>, se compararon las siguientes estrategias de purificación en el sobrenadante A. Dado que el sobrenadante contiene la IgG en una matriz bastante compleja, la primera precipitación con CaCl<sub>2</sub> y CEP pretendía obtener una IgG relativamente pura en una matriz definida (histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0). Por lo tanto, se eliminaron impurezas primero por adición de CaCl<sub>2</sub> a una concentración final de 250 mM. Posteriormente, el sobrenadante se sometió a CEP (precipitación con etanol frío) utilizando etanol al 25 % (v/v) (concentración final) (-10 °C, 2 h). Después, el precipitado disuelto se dividió en tres partes. A una parte, se añadió primero Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 300 mM a una concentración final de fosfato de 4 mM seguido de CaCl<sub>2</sub> 4000 mM a una concentración final de CaCl<sub>2</sub> de 250 mM. Las otras dos partes se mezclaron con CaCl<sub>2</sub> a una concentración final de 250 mM o con NaCl a una concentración final de 500 mM. El NaCl requiere una concentración más alta para obtener una conductividad similar a la de CaCl<sub>2</sub> 250 mM (~ 50 mS/cm). Como se muestra en la **Fig. 32**, la reducción de impurezas es más eficaz cuando se repite la precipitación con CaCl<sub>2</sub> y CEP (**Fig. 32(A)**) que aumentando la conductividad de la segunda etapa con CEP (**Fig. 32(C, D)**). Y cuando se añade (solamente) sal para aumentar la conductividad antes de la segunda etapa de CEP, el NaCl puede ser más eficaz (~ 2500 ppm) que el CaCl<sub>2</sub> (~ 4000 ppm). Aunque es posible aumentar la conductividad para mejorar la reducción de HCP durante la CEP, puede ser más conveniente llevar a cabo una segunda precipitación con CaCl<sub>2</sub>.

#### 4. Aislamiento de anticuerpos monoclonales del "sobrenadante A" del cultivo celular que contiene anticuerpo monoclonal

Se compararon seis estrategias de purificación diferentes (**Tabla 5**) para determinar las condiciones óptimas para la purificación del anticuerpo monoclonal del sobrenadante A que contiene anticuerpo monoclonal ("sobrenadante A" que contiene anticuerpo monoclonal que tiene un pl ~9,2) del sobrenadante de cultivo acelular.

Tabla 5

Estrategia de purificación	Tipo de Sal	Conductividad [mS/cm]	pH	Etanol [% (v/v)]	Temperatura [°C]	IgG [µg/ml]	Solubilidad prevista (Jungbauer et al. 2010c) Impurezas proteicas [µg/ml]	ADN [ng/ml]
A	CaCl <sub>2</sub>	20	8,5	5	4,0	23350	11	3
	CaCl <sub>2</sub>	20	8,5	30	-10,0	98	98	17
B	CaCl <sub>2</sub>	20	7,5	5	4,0	8545	31691	3
	CaCl <sub>2</sub>	20	7,5	30	-10,0	98	519	50
C	CaCl <sub>2</sub>	20	8,5	0	4,0	22756	2759	37
	CaCl <sub>2</sub>	20	6,5	25	-10	987	1460	127
D	NaCl	10	6,5	25	-10,0	64	1330	105
E	Sobrenadante de cultivo celular clarificado			25	-10		No disponible	
F	diluido a 1:4			25	-10		No disponible	

Las dos primeras estrategias de purificación "A" y "B" utilizan CaCl<sub>2</sub> para precipitar impurezas. "A" funciona a un pH alto y la precipitación inicial con CaCl<sub>2</sub> junto con etanol debería permitir la eliminación de ADN y también la de impurezas proteicas en la primera etapa. En la segunda etapa la concentración de etanol aumenta y la temperatura disminuye para la precipitación del anticuerpo. En el caso de "B" se aplicaron las mismas condiciones solo que el pH era inferior, 7,5 en lugar de 8,5. Este debería producir una menor eliminación de las impurezas proteicas. Sin embargo, este método podría ser ventajoso ya que el pH más alto en el método "A" podría dar lugar a modificaciones no deseadas del anticuerpo. La estrategia "C" es también similar, aunque se utilizan concentraciones de etanol ligeramente diferentes. La precipitación inicial utilizando CaCl<sub>2</sub> se realizó a un pH de 8,5 mientras que la segunda precipitación se realizó después a un pH de 6,5. Como la primera etapa de precipitación es una reacción rápida (~10 minutos), el pH alto no debe conducir a modificación del anticuerpo.

La estrategia "D" utiliza NaCl en lugar de CaCl<sub>2</sub> y tiene como objeto mantener las impurezas solubles mientras que el anticuerpo se precipita selectivamente. Las dos estrategias de precipitación restantes, "E" y "F", se utilizan como métodos de referencia en los que se utiliza el sobrenadante de cultivo celular clarificado sin otros ajustes excepto una dilución de 1:4 en el caso de la estrategia "F". Por simplicidad se analizaron solamente los precipitados disueltos (Tabla 6).

**Tabla 6**

	A	B	C	D	E	F
IgG [ $\mu$ g/ml]	589 $\pm$ 6	639 $\pm$ 36	643 $\pm$ 47	569 $\pm$ 213	591 $\pm$ 96	136 $\pm$ 14
Impurezas proteicas [ $\mu$ g/ml]	51 $\pm$ 23	7 $\pm$ 16	1 $\pm$ 28	310 $\pm$ 63	324 $\pm$ 170	276 $\pm$ 24
ADN [ng/ml]	109 $\pm$ 8	99 $\pm$ 42	120 $\pm$ 16	140 $\pm$ 45	220 $\pm$ 50	58 $\pm$ 42
Rendimiento (global)	68 %	71 %	77 %	59 %	59 %	54 %
Pureza	92 %	99 %	100 %	65 %	65 %	33 %
ADN [ppm]	185	155	187	246	372	426

La concentración de anticuerpos es bastante similar en todas las fracciones excepto en el método "F", lo cual es probable porque el sobrenadante que se utiliza para el método "F" se diluyó a 1:4. Las estrategias "B" y "C" son ventajosas sobre los otros métodos con respecto a la pureza. En comparación con "A" esto no es inesperado ya que "A" da como resultado una precipitación significativa de impurezas proteicas. La gran cantidad de impurezas proteicas precipitada resultante de la estrategia D fue bastante sorprendente. La cantidad de ADN recuperada utilizando las estrategias "A", "B", "C" y "D" fue bastante similar, lo que fue inesperado teniendo en cuenta la solubilidad prevista. El rendimiento global de las diferentes estrategias de purificación fue de aproximadamente 59-80 %. Se encontró que esto se debía a la diferencia de temperatura de la suspensión del precipitado (-10 °C) y de las jeringas y filtros (temperatura ambiente). Además, también se utilizó una velocidad de agitación bastante elevada (1000 rpm) y esto también podría haber afectado a la recuperación. La pureza para la etapa de captura se determinó mediante ensayo de Bradford y cromatografía analítica de proteína A. Para las estrategias "A", "B" y "C", se observaron purezas bastante altas. La eliminación de ADN puede mejorarse utilizando, por ejemplo, etapas de precipitación adicionales.

En la **Figura 5 se muestra** una comparación de los cromatogramas SEC analíticos de las diferentes estrategias de purificación. Como se muestra en la misma, las estrategias "A", "B" y "C" dan como resultado una pureza más alta en comparación con las estrategias "D", "E" y "F". Estas estrategias proporcionan la eliminación de impurezas de alto peso molecular, presumiblemente consistentes principalmente en ADN. Se pueden mejorar los rendimientos bajos con filtros de profundidad. La estrategia "A" puede reemplazarse por la estrategia "B", sin pérdida significativa de pureza o recuperación.

### 5. Aislamiento de anticuerpos monoclonales del "sobrenadante B" del cultivo celular que contiene anticuerpo monoclonal.

Se evaluaron cinco estrategias de purificación diferentes para determinar las condiciones óptimas para purificar el anticuerpo monoclonal del sobrenadante B del cultivo celular que contenía anticuerpo monoclonal ("sobrenadante B" que contiene el mismo anticuerpo que A, pero producido utilizando una línea celular diferente; pl ~9,2), como se resume en la **Tabla 7**.



Tabla 7

Estrategia de purificación	Tipo de Sal	Conductividad [mS/cm]	pH	Etanol [% (v/v)]	Temperatura [°C]	IgG [µg/ml]	Solubilidad prevista (Jungabuer et al. 2010c) Impurezas proteicas [µg/ml]	ADN [ng/ml]
G	CaCl <sub>2</sub>	20	6,5	5	-0,5	25528	1	41694
	CaCl <sub>2</sub>	70	6,5	10	-3,4	10870	1066	266
	CaCl <sub>2</sub>	70	6,5	40	-10,0	129	184	2516
H	CaCl <sub>2</sub>	28	7,5	5	4,0	126321	0	44328
	CaCl <sub>2</sub>	28	7,5	5	5,3	33426	7	113
	CaCl <sub>2</sub>	28	7,5	40	-10	357	75	1836
I	NaCl	20	7,5	40	-10,0	79	442	18
J	Sobrenadante de cultivo celular clarificado			40	-10		No disponible	
K	diluido a 1:4			40	-10		No disponible	

5 La purificación del sobrenadante B pudo realizarse a un pH de medio a bajo. El objetivo de las dos etapas de purificación inicial de la estrategia "G" era conseguir la eliminación de impurezas proteicas y ADN y la tercera etapa era para la precipitación final del anticuerpo. La estrategia "H" puede ser más eficaz en cuanto a la eliminación de impurezas proteicas o ADN pero puede ser menos eficaz en cuanto a la precipitación del anticuerpo en la tercera etapa. El objetivo de la estrategia "I" era conseguir la precipitación selectiva del anticuerpo mientras se mantenían las impurezas proteicas y el ADN en solución. El rendimiento global de las diferentes estrategias de purificación es de aproximadamente 25-50 % (**Tabla 8**).

**Tabla 8**

	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>J</b>	<b>K</b>
<b>IgG [µg/ml]</b>	885 ± 116		1211 ± 719	785 ± 64	462 ± 18
<b>Impurezas proteicas [µg/ml]</b>	1 ± 31	La IgG no se precipitó	313 ± 33	112 ± 78	85 ± 108
<b>ADN [ng/ml]</b>	122 ± 23		379 ± 262	173 ± 20	327 ± 300
<b>Rendimiento (etapa/global)</b>	47 %		41 %	24 %	25 %
<b>Pureza</b>	100 %		79 %	88 %	57 %
<b>ADN [ppm]</b>	138		313	220	708

10 En particular, se obtuvo un sobrenadante no modificado y diluido con un rendimiento solo del 25 %. Nuevamente se supuso que esto se debió a la diferencia de temperatura de la suspensión precipitada (-10 °C) y de las jeringas y filtros (temperatura ambiente) y a la velocidad de agitación bastante alta (1000 rpm). Además de un bajo rendimiento, la estrategia "G" parece ya bastante prometedora; el precipitado disuelto tiene una alta pureza y comparado con los otros métodos, la concentración de ADN es baja. Sorprendentemente, no se observó precipitación utilizando la estrategia "H". Esto puede deberse a un cambio de pH después de la reducción de la temperatura, tal vez porque la capacidad de tampón del sobrenadante del cultivo celular es menor a un pH de 7,5 que de 6,5. La estrategia "I", cuyo objetivo es precipitar selectivamente el anticuerpo mientras se mantienen las impurezas proteicas y el ADN en solución, dio como resultado una pureza baja y un rendimiento bajo. Las estrategias de referencia utilizando el sobrenadante de cultivo celular puro ("J") y diluido ("K") también dio como resultado un rendimiento bajo. Comparando los cromatogramas SEC (**Figura 6**) todas las estrategias excepto la estrategia "G" parece dar precipitados disueltos de alta pureza. Incluso los precipitados disueltos de las estrategias "J" e "I" tienen, a diferencia de la pureza medida dada en la **Tabla 8**, una pureza bastante alta.

25 También se utilizó una estrategia C modificada para aislar el anticuerpo monoclonal del sobrenadante B (**Tablas 9 y 10**). Fue sorprendente descubrir que la solubilidad del anticuerpo monoclonal resultante era diferente de la del aislado del sobrenadante A utilizando los mismos procedimientos (por ejemplo, como los anticuerpos monoclonales en A y B difieren solo en que cada uno de ellos se prepara utilizando una línea celular diferente).

Tabla 9

Estrategia de purificación	Tipo de Sal	Conductividad [mS/cm]	pH	Etanol [% (v/v)]	Temperatura [°C]	IgG [µg/ml]	Solubilidad prevista (Jungabuer et al. 2010c) Impurezas proteicas [µg/ml]	ADN [ng/ml]
C	CaCl <sub>2</sub>	29	8,5	0	4,0	1865316	80406,0	0,0
G	CaCl <sub>2</sub>	29	6,5	25	-10	1228,6	436,8	9,9
	CaCl <sub>2</sub>	29	6,5	5	-0,5	25528	1	41694
	CaCl <sub>2</sub>	79	6,5	20	-3,4	10870	1066	266
	CaCl <sub>2</sub>	70	6,5	40	-10	129	184	2516
I	NaCl	20	7,5	40	-10,0	79	442	18
J	Sobrenadante de cultivo celular clarificado			40	-10		No disponible	
K	diluido a 1:4			40	-10		No disponible	

**Tabla 10**

	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>I</b>	<b>J</b>	<b>K</b>
<b>IgG [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	1084 $\pm$ 45	310 $\pm$ 8	940 $\pm$ 140	625 $\pm$ 16	345 $\pm$ 3
<b>Impurezas proteicas [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	103 $\pm$ 16	13 $\pm$ 6	256 $\pm$ 2	86 $\pm$ 3	239 $\pm$ 16
<b>ADN [<math>\text{ng/ml}</math>]</b>	308 $\pm$ 101	28 $\pm$ 2	409 $\pm$ 76	206 $\pm$ 3	83 $\pm$ 18
<b>Rendimiento (global)</b>	70 %	22 %	60 %	96 %	99 %
<b>Pureza</b>	92 %	92 %	79 %	92 %	59 %
<b>ADN [ppm]</b>	283	92	434	553	296

En las **Tablas 2-9**, la pureza se calcula como contenido de IgG por cromatografía de proteína A y ensayo Bradford. Como se muestra en las **Tablas 2-9**, la estrategia C proporcionó un producto de anticuerpo monoclonal B con alta solubilidad. La estrategia G proporcionó una reducción significativa en el ADN pero también una pérdida significativa de IgG. El rendimiento global estaba entre 22 y 99 %. La modificación del sobrenadante del cultivo (por ejemplo, las estrategias J y K) proporcionó mayores rendimientos. En la **Fig. 8** se proporcionan cromatogramas SEC. Estos datos demuestran que la Estrategia C produce mayor pureza y rendimiento.

5

10

#### **6. Aislamiento de anticuerpos monoclonales del “sobrenadante C” del cultivo celular que contiene anticuerpo monoclonal**

Se evaluaron cinco estrategias de purificación diferentes para determinar las condiciones óptimas para purificar el anticuerpo monoclonal del sobrenadante C del cultivo celular que contiene el anticuerpo monoclonal (“sobrenadante C” que contiene anticuerpo monoclonal que tiene un  $pI$  de  $\sim 6,8$ ), como se resume en la **Tabla 12**.

Tabla 12

Estrategia de purificación	Tipo de Sal	Conductividad [mS/cm]	pH	Etanol [% (v/v)]	Temperatura [°C]	IgG [µg/ml]	Solubilidad 2010c) Impurezas proteicas [µg/ml]	Solubilidad prevista (Jungbauer et al.) [µg/ml]	ADN [ng/ml]
L	CaCl <sub>2</sub>	10	6,5	10	-5,3	3721	29		181
	CaCl <sub>2</sub>	40	6,5	20	-10	190	253		1218
M	CaCl <sub>2</sub>	10	7,5	5	-2,4	6902	59		158
	CaCl <sub>2</sub>	20	7,5	40	-2,4	46	292		380
N	NaCl	40	6,5	15	-5,3	292	1557		976
O		Sin modificación		15	-5,3			No disponible	
P		diluido a 1:4		15	-5,3			No disponible	

Las dos primeras estrategias de precipitación se centran de nuevo en la precipitación inicial de las impurezas, seguido por precipitación del anticuerpo. La estrategia "L" se puede realizar a un pH bajo (6,5) mientras que la estrategia "M" a un pH medio (7,5). La estrategia "N" tiene como objeto de nuevo la precipitación selectiva del anticuerpo mientras que las impurezas proteicas y el ADN se mantienen en solución. De nuevo, se realizaron estrategias de purificación de referencia utilizando sobrenadante no modificado y diluido, "O" y "P". Para la estrategia "L" se observó una precipitación inicial después de la primera etapa de precipitación. Esta fracción se muestra en la **Tabla 13** como "Precipitado 1 L" mientras "Precipitado 2 L" se refiere a la segunda precipitación observada.

**Tabla 13**

	<b>Precipitado 1 L</b>	<b>Precipitado 2 L</b>	<b>M</b>	<b>N</b>	<b>O</b>	<b>P</b>
<b>IgG [µg/ml]</b>	1274 ± 56	67 ± 12	728 ± 4	394 ± 23	1095 ± 6	333 ± 49
<b>Impurezas proteicas [µg/ml]</b>	531 ± 191	1 ± 17	251 ± 218	10 ± 102	482 ± 80	33 ± 554
<b>ADN [ng/ml]</b>	4480 ± 2026	34 ± 11	516 ± 51	219 ± 51	765 ± 9	227 ± 50
<b>Rendimiento (etapa/global)</b>	81 %	16 %	46 %	25 %	65 %	77 %
<b>Pureza</b>	71 %	99 %	74 %	98 %	69 %	91 %
<b>ADN [ppm]</b>	3830	507	709	556	699	682

En esta primera fracción, se encontró el rendimiento calculado (81 %), casi todas las IgG. Sin embargo, la eliminación de ADN así como la eliminación de impurezas proteicas fue insuficiente. Una vez más, esta precipitación inesperada podría deberse a cambios en el pH al cambiar la temperatura. Una precipitación insuficiente del ADN puede deberse a una insuficiencia de fosfato en el sobrenadante. Se puede suponer que el mecanismo de precipitación de ADN se basa en una precipitación con fosfato de calcio. La estrategia "L" podría mejorarse con la adición de fosfato y disminución simultánea de la adición de etanol y aumento de la temperatura. La estrategia "M" también dio como resultado altos niveles de ADN, probablemente debido a la falta de fosfato, pero también con bajo rendimiento y baja pureza. Una disminución adicional de la temperatura podría aumentar la eficacia de la precipitación del anticuerpo. El uso de menos etanol también puede aumentar la pureza. Sorprendentemente, la estrategia "N", donde el anticuerpo se precipita selectivamente, proporciona una buena pureza y eliminación de ADN. Sin embargo, el rendimiento fue inferior al satisfactorio (25 %). Una disminución adicional de la temperatura y/o un aumento de la concentración de etanol puede mejorar el rendimiento. El mejor resultado se obtuvo con la estrategia "P" que utilizó el sobrenadante diluido: la pureza fue de alrededor del 90 % y el rendimiento de alrededor del 77 % (por ejemplo, alto rendimiento). Adicionalmente, en las purificaciones descritas en la Tabla 15, se utilizó un método mejorado para la recuperación del precipitado: el pre-enfriamiento de jeringas y filtros. Esto dio como resultado un rendimiento y una pureza aún más altos (99 % y 99 % respectivamente para la estrategia P). Esta estrategia empleó un total de una dilución 1:8 del sobrenadante. Teniendo en cuenta los cromatogramas SEC de los precipitados de las diferentes estrategias de precipitación, la fracción de gran peso molecular no puede eliminarse por precipitación con etanol. Esto puede deberse a la precipitación incompleta de ADN causada por la baja concentración de fosfato en el sobrenadante, o estos pueden ser agregados de anticuerpos. Se determinó que el calcio era menos eficaz en la eliminación de ADN del sobrenadante C que del sobrenadante A o B. La adición adicional de fosfato puede ayudar a la eliminación del ADN.

La Estrategia C modificada (conductividad de 29 mS/cm) también se ensayó en el sobrenadante C (**Tabla 14**). No se esperaba que la Estrategia C proporcionarse una preparación "C" suficientemente pura considerando su baja solubilidad prevista. Uno habría predicho que el ADN co-precipitaría y que el rendimiento del anticuerpo monoclonal sería bajo. La **Tabla 15** proporciona una visión general de la composición de los diversos sedimentos disueltos. Como se muestra en la misma, a pesar de la adición de fosfato antes que la de cloruro de calcio, la eliminación de ADN no fue completa.

Tabla 14

Estrategia de purificación	Tipo de Sal	Conductividad [mS/cm]	pH	Etanol [% (v/v)]	Temperatura [°C]	IgG [µg/ml]	Solubilidad prevista (Jungabuer et al. 2010c) Impurezas proteicas [µg/ml]	ADN [ng/ml]
C	CaCl <sub>2</sub>	29	8,5	0	4,0	35932	88	4809,4
	CaCl <sub>2</sub>	29	6,5	25	-10	330,1	112,2	425,9
L	CaCl <sub>2</sub>	10	6,5	10	-5,3	37231	29	181
	CaCl <sub>2</sub>	40	6,5	20	-10	180	253	1218
M	CaCl <sub>2</sub>	10	7,5	5	-2,4	6902	59	158
	CaCl <sub>2</sub>	20	7,5	40	-2,4	46	292	380
N	NaCl	40	6,5	15	-5,3	292	1557	976
O		Sin modificación		15	-5,3		No disponible	
P		diluido a 1:4		15	-5,3		No disponible	

**Tabla 15**

	<b>C</b>	<b>L</b>	<b>M</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>O</b>
<b>IgG [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	931 $\pm$ 207	801 $\pm$ 53	1074 $\pm$ 68	385 $\pm$ 55	1098 $\pm$ 23	500 $\pm$ 87
<b>Impurezas proteicas [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	27 $\pm$ 77	8 $\pm$ 34	10 $\pm$ 43	6 $\pm$ 13	10 $\pm$ 17	26 $\pm$ 82
<b>ADN [<math>\text{ng/ml}</math>]</b>	557 $\pm$ 116	2908 $\pm$ 1340	538 $\pm$ 49	939 $\pm$ 269	790 $\pm$ 134	3024 $\pm$ 605
<b>Rendimiento (global)</b>	92 %	60 %	60 %	24 %	99 %	95 %
<b>Pureza</b>	96 %	99 %	99 %	99 %	99 %	99 %
<b>ADN [ppm]</b>	623	3637	443	2470	760	6296

Basándose en los resultados presentados en las **Tablas 2-13** y en las **Figuras 2-7B**, las estrategias C y P (dilución a 1:4 del sobrenadante en H<sub>2</sub>O seguido por la adición de etanol al 15 % (v/v)) son óptimas. Según los datos SEC, la Estrategia M puede proporcionar la pureza más alta, pero el rendimiento proporcionado por la Estrategia C es significativamente mayor.

### 7. Estrategia C adicional modificada (adición de fosfato)

Los sobrenadantes A, B y C se evaluaron por separado utilizando una estrategia modificada que implicaba la adición de fosfato. El método incluyó una precipitación inicial con CaCl<sub>2</sub> seguido de una primera precipitación con etanol. El sedimento de la primera precipitación con etanol se disolvió después en histidina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 6,5. Después, se añadió fosfato de sodio a una concentración final de 4 mM para ayudar a la segunda precipitación con CaCl<sub>2</sub>. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado y los precipitados se recuperaron por centrifugación. Este procedimiento de purificación se ilustra en la **Fig. 10**.

La **Tabla 16** proporciona el equilibrio de masa para la purificación a pequeña escala de IgG del sobrenadante B utilizando esta estrategia C adicional modificada. La pureza requerida (reducción de HCP de 100 veces) se consigue después de la segunda precipitación con etanol. Sin embargo, las etapas de precipitación adicionales dieron como resultado una pérdida significativa de IgG en el transcurso de la purificación. Cada etapa proporcionó un rendimiento de 64-77 %, dando como resultado un rendimiento global de 26 %. Esto es evidente a partir de los cromatogramas SEC (**Fig. 11**; nota: los resultados "C3" no representan en la **Tabla 16**). Se compararon los cromatogramas SEC para los precipitados con etanol y CaCl<sub>2</sub>. Como se muestran en la **Fig. 12**, las impurezas que se eluyen a alrededor de 12 minutos en los precipitados de la etapa 1 se eliminan en los precipitados de la etapa 2 (excepto C3).

**Tabla 16**

	IgG ( $\mu\text{g/ml}$ )	HCP (ppm)	ADN (ppm)	Pureza	Rendimiento (etapa/global)	Factor de reducción de HCP
Sobrenadante	1383	44792	752	12 %		
1 <sup>a</sup> precipitación con CaCl <sub>2</sub>	1020	ND	ND	14 %	75 %/75 %	
1 <sup>a</sup> precipitación con etanol	680	4505	83	>90 %	77 %/58 %	9,9
2 <sup>a</sup> precipitación con CaCl <sub>2</sub>	531	ND	ND	>90 %	71 %/41 %	
2 <sup>a</sup> precipitación con etanol	250	289	149	>95 %	64 %/26 %	155

Este proceso también se utilizó para purificar el anticuerpo del sobrenadante C. Los resultados se resumen en la **Tabla 17**. La reducción global de HCP fue de aproximadamente 80 veces. Los datos de recuperación se presentan en la **Fig. 13**. Como se muestra en la **Fig. 14**, las impurezas que se eluyen a alrededor de 12 minutos (por ejemplo, normalmente entre aproximadamente diez a 12 minutos) en los precipitados de la etapa 1 se eliminan en los precipitados de la etapa 2 (excepto C3).



**Tabla 17**

	IgG ( $\mu\text{g/ml}$ )	HCP (ppm)	ADN (ppm)	Pureza	Rendimiento (etapa/global)	Factor de reducción de HCP
Sobrenadante	1825	145561	9161	~25 %		
1ª precipitación con $\text{CaCl}_2$	1573	ND	ND	24 %	88 %/88 %	
1ª precipitación con etanol	1196	17201	126	>90 %	81 %/71 %	8,5
2ª precipitación con $\text{CaCl}_2$	820	ND	ND	>90 %	92 %/65 %	
2ª precipitación con etanol	703	1732	204	>95 %	87 %/57 %	84

En las **Tablas 18, 19, 20 y 21** se presentan los datos del equilibrio de masa resultantes de la purificación del anticuerpo monoclonal del sobrenadante A, B, C o D utilizando la estrategia C modificada (**Fig. 17**):

5

**Tabla 18**

	IgG [ $\mu\text{g/ml}$ ]	HCP [ppm]	ADN [ppm]	Pureza	Rendimiento (etapa/global)	Factor de reducción de HCP
Sobrenadante	1508	32949	642	29 %		
1ª precipitación con $\text{CaCl}_2$	1400	n.d	n.d	29 %	94 %/94 %	
1ª precipitación con etanol	817	4000	131	>90 %	77 %/72 %	10
2ª precipitación con $\text{CaCl}_2$	306	n.d	n.d	>90 %	78 %/56 %	
2ª precipitación con etanol	209	752	54	>95 %	33 %/18 %	43

**Tabla 19**

	IgG [ $\mu\text{g/ml}$ ]	HCP [ppm]	ADN [ppm]	Pureza	Rendimiento (etapa/global)	Factor de reducción de HCP
Sobrenadante	789	174538	3335	~ 12 %		
1ª precipitación con $\text{CaCl}_2$	534	n.d	n.d	11 %	95 %/95 %	
1ª precipitación con etanol	394	53345	492	>90 %	69 %/66 %	3
2ª precipitación con $\text{CaCl}_2$	297	n.d	n.d	>90 %	79 %/52 %	
2ª precipitación con etanol	170	1825	302	>95 %	58 %/30 %	95

Tabla 20

	IgG [µg/ml]	HCP [ppm]	ADN [ppm]	Pureza	Rendimiento (etapa/global)	Factor de reducción de HCP
Sobrenadante	1997	386702	22131	~23 %		
1ª precipitación con CaCl <sub>2</sub>	1960	n.d.	n.d.	26 %	95 %/95 %	
1ª precipitación con etanol	1265	256657	739	>90 %	98 %/93 %	3
2ª precipitación con CaCl <sub>2</sub>	1128	n.d	n.d	>90 %	93 %/86 %	
2ª precipitación con etanol	899	5362	398	>99 %	80 %/67 %	72

Tabla 21

	IgG [µg/ml]	HCP [ppm]	ADN [ppm]	Pureza	Rendimiento (etapa/global)	Factor de reducción de HCP
Sobrenadante	2948	90755	217	~30 %		
1ª precipitación con CaCl <sub>2</sub>	2544	n.d.	n.d.	29 %	86 %/86 %	
1ª precipitación con etanol	1593	122503	101	>90 %	84 %/72 %	1
2ª precipitación con CaCl <sub>2</sub>	1345	n.d	n.d	>90 %	86 %/62 %	
2ª precipitación con etanol	998	8254	36	>95 %	74 %/46 %	1

## 5 8. Procedimientos de aislamiento a gran escala

En algunas realizaciones a menor escala, el uso de CaCl<sub>2</sub> 50 mM para la etapa de precipitación con CaCl<sub>2</sub> proporcionó un rendimiento de solo aproximadamente 18 % y una reducción de HCP de solo aproximadamente 43 veces. A mayores concentraciones de CaCl<sub>2</sub> (añadido hasta 29 mS/cm), se observó una reducción de HCP (159 veces) y un rendimiento (26 %) significativamente más altos. En los procedimientos de aislamiento a gran escala descritos en la presente memoria, se seleccionó CaCl<sub>2</sub> 250 mM (~50 mS/cm) que proporcionaba una reducción de HCP alta y un buen rendimiento. La etapa de CEP se mantuvo a -10 °C, durante 2 h y con etanol al 25 % (v/v). La precipitación con CaCl<sub>2</sub> se realizó a temperatura ambiente utilizando un vaso de precipitados y un agitador magnético. Para el ajuste del pH, se utilizaron concentraciones de CaCl<sub>2</sub> y de fosfato a HCl 25 %, NaOH 10,0 M, CaCl<sub>2</sub> 5,0 M y una solución de N<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 M. Para CEP, las soluciones se transfirieron a un reactor EasyMax. La **Fig. 18** describe el perfil de temperatura, la respuesta de la sonda IR y la concentración de etanol de la primera (A) y la segunda (B) precipitación CEP en el reactor EasyMax. Se añadió etanol durante 4 h mientras que simultáneamente se disminuía la temperatura de 4 °C a -10 °C donde se mantuvo después durante 2 h hasta alcanzar el equilibrio de la precipitación. Como se muestra en la **Fig. 18**, la primera y segunda precipitación CEP comienza a alrededor de tres horas (-6 °C, etanol >20 % (v/v)). La turbidez alcanza rápidamente su equilibrio, lo que sugiere que la precipitación es una reacción bastante rápida. Durante la purificación, se extrajeron muestras después de cada etapa de precipitación y se analizaron mediante cromatografía analítica de proteína A, SEC, y ensayo ELISA CHO HCP (**Tabla 22**). Como se muestra en la misma, el rendimiento aumentó a 64 % y se observó una reducción alta de HCP (83 veces). Como se muestra en la **Fig. 19**, el precipitado disuelto final tiene una pureza alta y la IgG obtenida es, en gran medida, monomérica.

En otra realización, el precipitado se aisló después de la segunda precipitación con CaCl<sub>2</sub> utilizando un filtro de jeringa (Whatman, 0,2 mm) en lugar de centrifugación. Las muestras se extrajeron después de cada etapa de precipitación y se analizaron por cromatografía analítica de proteína A, SEC y ensayo ELISA CHO HCP (**Tabla 23**). Como se muestra en la misma, el rendimiento aumentó a 71 % y la reducción de HCP permaneció alta (128 veces). Sin embargo, debido a la mayor exposición a temperatura ambiente, el precipitado recogido por filtración (2ª CEP)

5 parcialmente disuelto y la fracción soluble de IgG encontrada en el sobrenadante fue más alta (167 mg/l) que la esperada (64 mg/l) dando como resultado un rendimiento más bajo en la etapa para la 2ª CEP (84 %) que para la 1ª CEP (94 %). Suponiendo una concentración similar de la fracción soluble de la 2ª CEP en cuanto a la 1ª CEP, el rendimiento de la etapa, así como el rendimiento global, podría haber sido mayor (rendimiento de etapa ~95 %; rendimiento global ~80.5 %). Como se observa en la **Fig. 20**, el precipitado final disuelto tiene una pureza alta y la IgG obtenida es, en gran medida, monomérica. Este procedimiento se repitió con otra muestra de sobrenadante y se observaron resultados similares (reducción de HCP de 91 veces; **Tabla 24, Fig. 21**). Como se muestra en la **Fig. 21**, el precipitado resultante tiene una pureza alta y la IgG obtenida es, en gran medida, monomérica.

10 Este procedimiento también se realizó utilizando el sobrenadante C (**Tabla 25**). Como se muestra en la misma, el rendimiento aumentó al 91 % pero la reducción de HCP fue solo de 23 veces. También puede observarse en la **Fig. 22**, que el precipitado final disuelto tiene una pureza alta aunque contiene una cantidad más grande de agregados de IgG.

15 Este procedimiento se llevó a cabo también con el Sobrenadante D. La precipitación se realizó como se ha descrito anteriormente y las muestras extraídas después de cada etapa de precipitación se analizaron por cromatografía analítica de proteína A, SEC y ensayo ELISA CHO HCP (**Tabla 26**). El rendimiento aumentó a 76 % pero la reducción de HCP fue solo de 48 veces. Como se muestra en la **Fig. 23**, el precipitado final disuelto es IgG con una pureza alta.

Tabla 22

*Purificación de anticuerpo monoclonal del sobrenadante A a gran escala (70 ml) utilizando el reactor EasyMax*

	Factor de dilución	IgG [µg/ml]	Rendimiento de IgG etapa	global	Monómero *	**	Pureza *	**	HCP [ppm]	Reducción HCP etapa	global
Sobrenadante	1,00	1222							54212	0	0
1 <sup>er</sup> sobrenadante CaCl <sub>2</sub>	1,12	1029	94 %	94 %					44641	1,2	1,2
1 <sup>er</sup> precipitado CEP	1,00	874	85 %	80 %					6922	6,5	7,8
2 <sup>o</sup> sobrenadante CaCl <sub>2</sub>	1,07	684	86 %	69 %					3157	2,3	17,2
2 <sup>o</sup> precipitado CEP	1,00	636	93 %	64 %	>99,9 %	>99,9 %	>99,9 %	95,3 %	650	4,9	83,4

Tabla 23

*Purificación de anticuerpo monoclonal del sobrenadante A a gran escala (70 ml) utilizando el reactor EasyMax*

	Factor de dilución	IgG [µg/ml]	Rendimiento de IgG etapa	Rendimiento de IgG global	Monómero *	Pureza **	HCP [ppm]	Reducción HCP etapa	Reducción HCP global
Sobrenadante	1,00	1521					135336	0	0
1 <sup>er</sup> sobrenadante CaCl <sub>2</sub>	1,10	1379	99 %	99 %			69877	1,8	1,8
1 <sup>er</sup> precipitado CEP	1,00	1249	91 %	90 %			15829	4	7,1
2 <sup>o</sup> sobrenadante CaCl <sub>2</sub>	1,07	1065	94 %	95 %			2615	4,7	36,2
2 <sup>o</sup> precipitado CEP	1,00	894	84 %	71 %	>99,9 %	>99,9 %	650	3,5	128,3

Tabla 24

*Purificación de anticuerpo monoclonal del sobrenadante A a gran escala (70 ml) utilizando el reactor EasyMax*

	Factor de dilución	IgG [µg/ml]	Rendimiento de IgG etapa	Rendimiento de IgG global	Monómero *	Pureza **	HCP [ppm]	Reducción HCP etapa	Reducción HCP global
Sobrenadante	1,00	2563,4					109231		
1 <sup>er</sup> sobrenadante CaCl <sub>2</sub>	1,00	2379,4	98,0 %	98,0 %			26773	4,1	4,1
1 <sup>er</sup> precipitado CEP	1,13	2172,4	91,3 %	89,3 %	98,7 %	88,4 %	15224	1,8	7,2
2 <sup>o</sup> sobrenadante CaCl <sub>2</sub>	1,00	1991,7	98,1 %	87,6 %			3865	3,9	28,3
2 <sup>o</sup> precipitado CEP	1,35	1816,4	91,2 %	79,9 %	99,7 %	99,9 %	1202	3,2	90,9

Tabla 25

*Purificación de anticuerpo monoclonal del sobrenadante C a gran escala (70 ml) utilizando el reactor EasyMax*

	Factor de dilución	IgG [µg/ml]	Rendimiento de etapa	Rendimiento de IgG global	Monómero *	Pureza **	HCP [ppm]	Reducción HCP etapa	HCP global
Sobrenadante		3322					81752		
1 <sup>er</sup> sobrenadante CaCl <sub>2</sub>	1,09	2826	92 %	92 %					
1 <sup>er</sup> precipitado CEP	1,00	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.	n.d.
2 <sup>o</sup> sobrenadante CaCl <sub>2</sub>	1,07	2337	89 %	82 %					
2 <sup>o</sup> precipitado CEP	1,00	2162	93 %	76 %	99,4 %	n.d.	3702	22,09	48,65

Tabla 26

*Purificación de anticuerpo monoclonal de sobrenadante D a gran escala (70 ml) utilizando el reactor EasyMax*

	Factor de dilución	IgG [µg/ml]	Rendimiento de IgG etapa	global	Monómero *	Pureza **	HCP [ppm]	Reducción HCP etapa	HCP global
Sobrenadante	1,00	1222					54212	0	0
1º sobrenadante CaCl <sub>2</sub>	1,12	1029	94 %	94 %			44641	1,2	1,2
1º precipitado CEP	1,00	874	85 %	80 %			6922	6,5	7,8
2º sobrenadante CaCl <sub>2</sub>	1,07	684	86 %	69 %			3157	2,3	17,2
2º precipitado CEP	1,00	636	93 %	64 %	>99,9 %	>99,9 %	650	4,9	83,4



### 9. Método modificado que incluye una sola precipitación con CaCl<sub>2</sub>

Se llegó a la conclusión de que la primera etapa de precipitación con etanol tenía el impacto más significativo sobre la eliminación de impurezas (HPC). En algunos casos, se observó que la primera precipitación con CaCl<sub>2</sub> solo influía ligeramente en la eliminación de impurezas y producía una pérdida significativa de IgG (por ejemplo, 25 %). Por lo tanto se desarrolló una estrategia modificada en la que se eliminó la primera etapa de precipitación con CaCl<sub>2</sub> mientras se mantenían la primera y la segunda etapa de precipitación con etanol y la segunda precipitación con CaCl<sub>2</sub>.

Para optimizar la primera etapa de precipitación con etanol, se mezcló sobrenadante A bruto con etanol a una concentración final de etanol de 10 %, 15 %, 20 %, 25 % o 30 %. La solubilidad de IgG en cada preparación se muestra en la **Fig. 15(A)**. Como se muestra en la misma, la IgG no se precipita en presencia de etanol al 10 % sino que comienza a precipitar con etanol al 15 % y alcanza el equilibrio en presencia de etanol al 25 %. La **Fig. 15(B)** muestra que no hay diferencias entre la IgG y el ADN en un 20 %, 25 % y 30 %, pero que hay una diferencia significativa en HCP (etanol al 30% significativamente mayor). Por lo tanto, se seleccionó una concentración final de 25 % como óptima para la primera etapa de precipitación con etanol.

También se examinó el efecto del lavado después de la primera etapa de precipitación con etanol. El precipitado de la precipitación con etanol se recogió por centrifugación y se disolvió inmediatamente en tampón de histidina (histidina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 6,0) o se lavó tres veces con etanol al 25 % antes de disolverse en el tampón de histidina. Como se muestra en la **Tabla 27**, el lavado dio como resultado un rendimiento significativamente reducido (60 %) sin una mejora significativa en la reducción de HCP (de 2,9 veces sin lavado a 3,6 veces con lavado).

20

**Tabla 27**

	Sin lavado	Con lavado (3 veces)
IgG (µg/ml)	1109	778
Rendimiento	85 %	60 %
HCP (ppm)	12351	9893
Factor de reducción de HCP	2,9	3,6

Como se mencionó anteriormente, la etapa de precipitación con CaCl<sub>2</sub> que precede a la primera etapa de precipitación con etanol se excluyó. Sin embargo, la precipitación con CaCl<sub>2</sub> después de la primera precipitación con etanol se mantuvo y se optimizó como se describe en la presente memoria. Se evaluó una variedad de condiciones como se muestra en la **Tabla 28**:

25

**Tabla 28**

(<q.=por debajo de la cuantificación; <d.=por debajo de la detección)

Fosfato [mM]	CaCl <sub>2</sub> [mM]	pH	Temp [°C]	ADN [ng/ml]	Rendimiento [ %]	Pureza [ %]
1	50	6,5	4	881,0	102 %	65 %
1	50	6,5	20	901,7	103 %	66 %
1	50	8,5	4	<q.	100 %	69 %
1	50	8,5	20	<q.	101 %	70 %
1	150	6,5	4	374,0	100 %	58 %
1	150	6,5	20	160,5	100 %	57 %
1	150	8,5	4	<d.	98 %	59 %
1	150	8,5	20	<d.	99 %	60 %
4	50	6,5	4	53,7	108 %	76 %
4	50	6,5	20	<q.	88 %	71 %
4	50	8,5	4	<q.	98 %	71 %
4	50	8,5	20	<q.	100 %	72 %
4	150	6,5	4	<d.	97 %	62 %
4	150	6,5	20	<d.	75 %	52 %
4	150	8,5	4	<d.	96 %	63 %
4	150	8,5	20	<d.	98 %	61 %

Como se muestra en la **Tabla 28**, la floculación de ADN es óptima a pH básico (pH 8,5). El ADN no se detecta en el sobrenadante restante cuando se utiliza  $\text{CaCl}_2$  150 mM. El rendimiento es típicamente bastante alto (96-100 %). El rendimiento fue bajo en condiciones de 20 °C, pH 6,4, fosfato 4 mM (75 % utilizando  $\text{CaCl}_2$  150 mM u 88 % utilizando  $\text{CaCl}_2$  50 mM). Se determinó que para esta etapa las condiciones óptimas eran 20 °C, pH 8,5, fosfato 4 mM,  $\text{CaCl}_2$  50 mM, porque el ADN estaba por debajo de los niveles cuantificables y tanto el rendimiento como la pureza eran altos.

También se optimizó la segunda etapa de precipitación con etanol, que siguió a la primera etapa de precipitación con etanol (-10 °C, etanol 25 %) y a las etapas de precipitación con  $\text{CaCl}_2$  (20 °C, pH 8,5 fosfato 4 mM,  $\text{CaCl}_2$  50 mM) descritas anteriormente. Se añadió etanol a una concentración final de 10 %, 15 %, 20 %, 25 % o 30 %. Después de incubación durante dos horas a -10 °C, el precipitado se recogió por centrifugación y se disolvió en tampón de histidina (histidina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 6,0). Después, se analizaron las fracciones solubles y precipitadas, como se presenta en las **Figs. 2-7I**. Como se muestra en las mismas, no se observó ninguna diferencia significativa entre estas condiciones. Por lo tanto, como óptimo se seleccionó un porcentaje de etanol de veinticinco por ciento.

La concentración de HCP en el sedimento disuelto, resultante de este método modificado fue significativamente mayor que la producida por el método original (por ejemplo, **Figs. 1, 10**). Aunque la presencia de  $\text{CaCl}_2$  parecía no influir en la concentración de HCP, la presencia de  $\text{CaCl}_2$  mejoró la eliminación de HCP en la posterior precipitación con etanol (**Tabla 29**).

**Tabla 29**

	Método original	Sin lavado	Con lavado (3 veces)
Sobrenadante A	36071	36071	36071
1ª precipitación con $\text{CaCl}_2$	32863		
1ª precipitación con etanol	2530	12351	9893

Basándose en estos resultados, la etapa de precipitación con  $\text{CaCl}_2$  óptima puede ser: 1) fosfato 4 mM (por ejemplo, el sobrenadante puede ajustarse a este nivel); 2)  $\text{CaCl}_2$  50 mM, y 3) -20 °C (**Fig. 17**).

Como se muestra en la presente memoria, las variaciones en las etapas de precipitación con etanol no proporcionan típicamente mejoras en el contenido o rendimiento de HCP, aunque se determinó que el 25 % de etanol y -10 °C eran óptimos. El lavado tuvo un efecto beneficioso sobre la pureza pero también dio como resultado un rendimiento más bajo. Típicamente, después, las etapas de lavado pueden no ser necesarias. Y, mientras que la etapa de  $\text{CaCl}_2$  puede tener poco efecto en la eliminación de HCP, se encontró que era una etapa precursora importante (por ejemplo, crítica) para la etapa de precipitación con etanol. El uso de  $\text{CaCl}_2$  50 mM también se encontró que era óptimo (por ejemplo, en comparación con  $\text{CaCl}_2$  120-150 mM, en el método original). Mientras que el rendimiento fue típicamente comparable, menores concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  típicamente llevaron a una mayor reducción de HCP.

#### **10. Influencia de las condiciones de filtración sobre la recuperación y la pureza después de precipitación a -10 °C**

Los rendimientos observados para las estrategias de purificación evaluadas fueron a veces significativamente más bajos de lo esperado. Comparando la configuración experimental de la exploración del filtro con las condiciones de las purificaciones reales, las diferencias significativas resultaban de cambios en la velocidad del agitador y la temperatura. La exploración del filtro se realizó en la cámara fría a 4 °C en un recipiente de 400 ml con una velocidad de agitador de 400 rpm. Las purificaciones se realizaron a temperatura ambiente. Solo el precipitado y la solución de lavado estaban a la temperatura requerida (por ejemplo, -10 °C). La velocidad del agitador puede ser significativamente mayor (1000 rpm para un volumen de 10 ml). Se seleccionaron tres parámetros para la exploración: velocidad del agitador, condiciones de lavado y la temperatura de conservación de las jeringas y filtros. Como el reactor del laboratorio utilizado para la exploración del método de precipitación estaba a temperatura ambiente, toda la manipulación tenía que realizarse a esa temperatura. Con el fin de evaluar si estos parámetros dieron como resultado la baja recuperación, se realizó una segunda exploración de filtro, como se resume en la **Tabla 30**.

**Tabla 30**

Parámetros	Variación
Velocidad del agitador	400 rpm
Lavado	1000 rpm Con lavado Sin lavado
Temperatura de conservación de jeringas y filtros	Temperatura ambiente (TA) 4 °C (nevera) -20 °C (congelador)

5 Para cada experimento, se añadió etanol a 96 % (v/v) a 5 ml de sobrenadante (por ejemplo, sobrenadante A) a una concentración final de etanol de ~40 % (v/v). Las suspensiones se equilibraron durante 2 h a -10 °C y se recogieron por filtración utilizando un filtro de profundidad. Si era preciso, el precipitado se lavaba enjuagando el filtro con una solución de etanol templada al 40 % (v/v). Las jeringas y los filtros se conservaron a la temperatura respectiva hasta su utilización. Las muestras obtenidas se ofrecen en la **Tabla 31**.

**Tabla 31**

Proceso n.º	Velocidad del agitador	Lavado	Temperatura de conservación
1	400	Con lavado	TA
2	400	Sin lavado	TA
3	400	Con lavado	4 °C
4	400	Sin lavado	4 °C
5	400	Con lavado	-20 °C
6	400	Sin lavado	20 °C
7	1000	Con lavado	TA
8	1000	Sin lavado	TA
9	1000	Con lavado	4 °C
10	1000	Sin lavado	4 °C
11	1000	Con lavado	-20 °C
12	1000	Sin lavado	-20 °C

10 La concentración de IgG en el sobrenadante de precipitación, en la fracción de lavado y en el precipitado disuelto, se determinó por cromatografía analítica con proteína A. La IgG presente en el sobrenadante de precipitación y en la fracción de lavado estaba por debajo del límite de cuantificación inferior del método utilizado. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que el rendimiento es solo despreciable diferente del equilibrio de masa. Para una primera estimación del impacto de los tres factores principales se calculó el rendimiento medio (**Figura 24**). La velocidad del agitador no tuvo ningún impacto significativo sobre el rendimiento medio (~70 %) pero la desviación típica del rendimiento es para una velocidad del agitador de 400 rpm significativamente mayor que para 1000 rpm (probablemente debido a diferencias en el tamaño y densidad de la partícula). La entrada de energía, en este caso debido a la agitación mecánica, es un parámetro importante para el tamaño y la densidad de las partículas. En general, el tamaño de partícula disminuye y la densidad de la partícula aumenta con la entrada de energía. Además, se requiere una cierta entrada de energía para formar partículas homogéneas. Se supone que las partículas obtenidas a una velocidad de agitador de 400 rpm son grandes, no tan densas y de tamaño no homogéneo. Por lo tanto, se pueden observar diferencias significativas en el rendimiento. Por otra parte, las partículas obtenidas a una velocidad de agitador de 1000 rpm son más pequeñas pero más densas y deberían tener una distribución de tamaño homogénea. Se determinó que el lavado producía una pérdida de IgG de aproximadamente 10 % en comparación con cuando no se realizaba lavado. La desviación típica es similar en ambos casos. Se observó que la conservación a temperatura ambiente daba como resultado un rendimiento más bajo (60 %) en comparación con una conservación a 4 °C (80 %) o -20 °C (70 %).

En la **Figura 25** se proporciona un análisis más detallado de la influencia de la velocidad del agitador y del lavado. Los precipitados obtenidos a una velocidad de agitador de 400 rpm muestran un rendimiento medio similar cuando se lavan o cuando no se lavan. Solo la desviación típica de las muestras que se lavaron es mayor que la de las muestras que no se lavaron. En caso de la mayor velocidad del agitador, la desviación típica de los precipitados lavados y la de los no lavados, es similar, pero la media de los precipitados lavados es menor. Se supuso que las partículas más pequeñas formadas a 1000 rpm se disolvían más fácilmente que las partículas a 400 rpm. Por lo tanto, el lavado de las partículas formadas a 1000 rpm tenía más impacto. Por otro lado, las partículas formadas a 400 rpm no son homogéneas, por lo tanto la mayor desviación típica se observa en caso del precipitado lavado. Dependiendo de la muestra, una parte del precipitado puede disolverse fácilmente durante el lavado. En estos experimentos se encontró una velocidad de agitador óptima de aproximadamente 600 rpm. Una velocidad más baja puede conducir a un tamaño de partícula no homogéneo y a un rendimiento variable. Una velocidad de agitación

más alta dará lugar a partículas pequeñas que se pueden disolver fácilmente durante el lavado. Las jeringas y los filtros también pueden conservarse a 4 °C, lo que también debe reducir significativamente la pérdida de precipitado durante la recogida. Con estas condiciones, se repetirá la evaluación de las estrategias de precipitación. Después una aplicación a mayor escala, la recogida puede realizarse por centrifugación.

## 5 11. Perfil de elución de precipitado disuelto – Recuperación y pureza

También se estudió el efecto de eliminación por lavado de los filtros de profundidad utilizados para la recogida por recuperación y disolución. El sobrenadante A con anticuerpo monoclonal se precipitó utilizando etanol al 40 % (v/v) y se disolvió con alícuotas de tampón de histidina 1 ml (histidina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 6,0). El efluente se recogió y analizó mediante cromatografía analítica con proteína A. La pureza de las fracciones del efluente también se determinó por comparación del área del pico de IgG y las áreas de pico totales. Se encontró que este método era suficiente para controlar la tendencia de la pureza de la fracción efluente. En la **Fig. 26**, se representa la concentración y pureza de la fracción efluente. Como se muestra en la misma, la primera fracción tiene baja pureza debido a la precipitación del sobrenadante que todavía está presente en el filtro. La pureza aumenta en la segunda fracción y además se observa un pico de concentración. En las siguientes fracciones, no se observó ninguna tendencia con respecto a la pureza (aunque varió entre 40-50 %). Esta no es demasiada alta y puede atribuirse a condiciones de precipitación inespecíficas y al método bastante sencillo de determinación de pureza. Se observó que la concentración era estable en las primeras cinco fracciones antes de una eliminación por lavado exponencial. A partir del rendimiento calculado de cada fracción, y del rendimiento acumulativo, se estimó que un volumen de disolución de aproximadamente 10 ml era suficiente para obtener una recuperación adecuada, aunque no completa, de IgG precipitada. La recogida de la precipitación por filtración es típicamente más útil a menor escala (<20 ml). Con mayor escala, puede utilizarse la centrifugación, ya que permite manipular de manera más rápida y sencilla volúmenes más grandes.

## C. Conclusiones

La comparación de las estrategias de purificación de los sobrenadantes A, B y C que contienen anticuerpo monoclonal mostró sorprendentemente que las estrategias de purificación presentadas en la presente memoria se pueden utilizar para separar selectivamente las IgG de las impurezas proteicas y ADN directamente del sobrenadante del cultivo celular con una pureza y un rendimiento excepcionales. Por ejemplo, para el sobrenadante A, las estrategias de purificación B y C pueden ser óptimas. Para el sobrenadante B, las estrategias C y K pueden ser óptimas. Y para el sobrenadante C, las estrategias de purificación C, M y O pueden ser óptimas. La estrategia de purificación C proporciona buenos resultados para todos los sobrenadantes y por lo tanto puede ser la estrategia generalmente más óptima. Además, en algunos casos, puede ser óptimo realizar dos precipitaciones para obtener una pureza satisfactoria (HCP). La estrategia C modificada (por ejemplo, **Fig. 17**) también puede ser óptima y generalmente aplicable al aislamiento de muchos anticuerpos monoclonales diferentes (por ejemplo, de puntos isoeléctricos diferentes) de diferentes fuentes (por ejemplo, sobrenadante de varios tipos de células). Un rendimiento reducido puede resultar del método de recuperación del precipitado (por ejemplo, lavado y disolución). En particular, la reducción de la diferencia de temperatura entre el precipitado y las jeringas y los filtros utilizando jeringas y filtros templados (4 °C) proporciona un rendimiento aumentado. La comparación de los diferentes alcoholes con respecto a su efecto sobre la precipitación de anticuerpos, condujo a la conclusión de que el etanol podría reemplazarse por metanol o isopropanol sin cambios obvios en el comportamiento de precipitación del anticuerpo.

Aunque la presente invención se ha descrito en términos de las realizaciones preferidas, se entiende que se producirán variaciones y modificaciones por los expertos en la técnica. Por lo tanto, se pretende que las reivindicaciones adjuntas cubran todas estas variaciones equivalentes que entran dentro del alcance de la invención como se reivindica.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para aislar una proteína de un sobrenadante de cultivo celular que comprende:

(i) Alternativa 1:

- 5 a1) combinar un sobrenadante de cultivo celular que comprende la proteína, con una sal catiónica divalente en condiciones adecuadas para la precipitación de impurezas en el sobrenadante para producir un sobrenadante primario que comprende la proteína;
- b1) combinar el sobrenadante primario con un alcohol alifático en condiciones adecuadas para formar un precipitado que contiene la proteína y aislar el precipitado que contiene la proteína;
- 10 c1) volver a suspender el precipitado que contiene la proteína en un tampón que comprende una sal catiónica divalente en condiciones adecuadas para la precipitación de impurezas a partir del mismo para producir una solución que contiene la proteína; y
- d1) combinar la solución que contiene la proteína con un alcohol alifático en condiciones adecuadas para formar un precipitado que contiene la proteína purificada y aislar el precipitado que contiene la proteína purificada;

15 o  
(ii) Alternativa 2:

- a2) combinar un sobrenadante de cultivo celular que comprende la proteína, con un alcohol alifático en condiciones adecuadas para formar un precipitado que contiene la proteína y aislar el precipitado que contiene la proteína;
- 20 b2) volver a suspender el precipitado que contiene la proteína en un tampón que comprende una sal catiónica divalente en condiciones adecuadas para la precipitación de impurezas a partir del mismo para producir una solución que contiene la proteína; y
- c2) combinar la solución que contiene la proteína, con un alcohol alifático en condiciones adecuadas para formar un precipitado que contiene la proteína purificada y aislar el precipitado que contiene la proteína purificada.
- 25

2. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína es un anticuerpo.

3. El método de la reivindicación 1, en el que el sobrenadante de cultivo celular es un sobrenadante de cultivo acelular.

4. El método de la reivindicación 1, en el que el alcohol alifático es etanol.

30 5. El método de la reivindicación 1, en el que las condiciones de la etapa a1) comprenden una concentración de fosfato menor o igual a 6 mM.

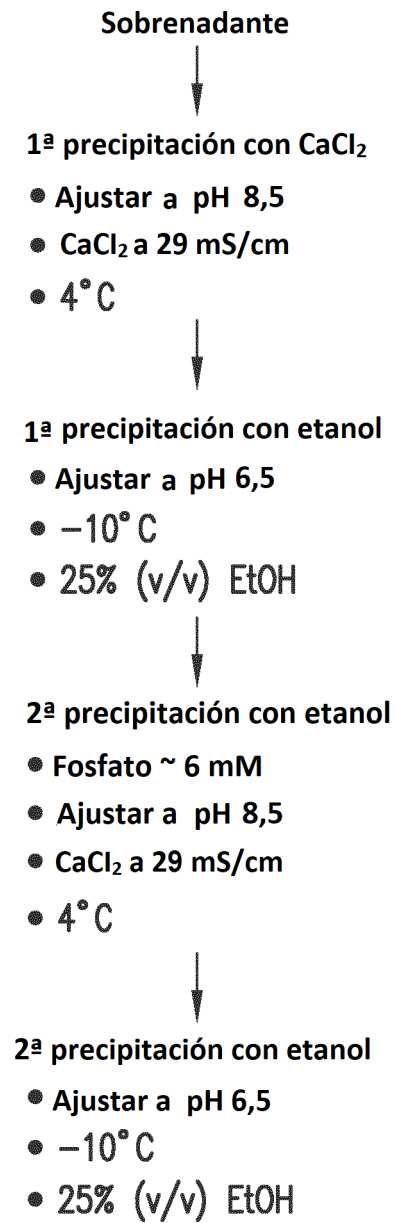
6. El método de la reivindicación 2, en el que las condiciones de la etapa c1) o b2) comprenden una concentración de fosfato menor de 6 mM.

35 7. El método de la reivindicación 1, en el que las condiciones en cada una de las etapas comprenden un pH de 6,5 a 8,5.

8. El método de la reivindicación 1, en el que la sal catiónica divalente es  $\text{CaCl}_2$ .

9. El método de la reivindicación 1, en el que las condiciones de las etapas a1), c1) y b2) comprenden un pH de aproximadamente 8,5.

40 10. El método de la reivindicación 1, en el que las condiciones de las etapas b1), d1), a2) y c2) comprenden un pH de aproximadamente 6,5.



**FIG. 1**

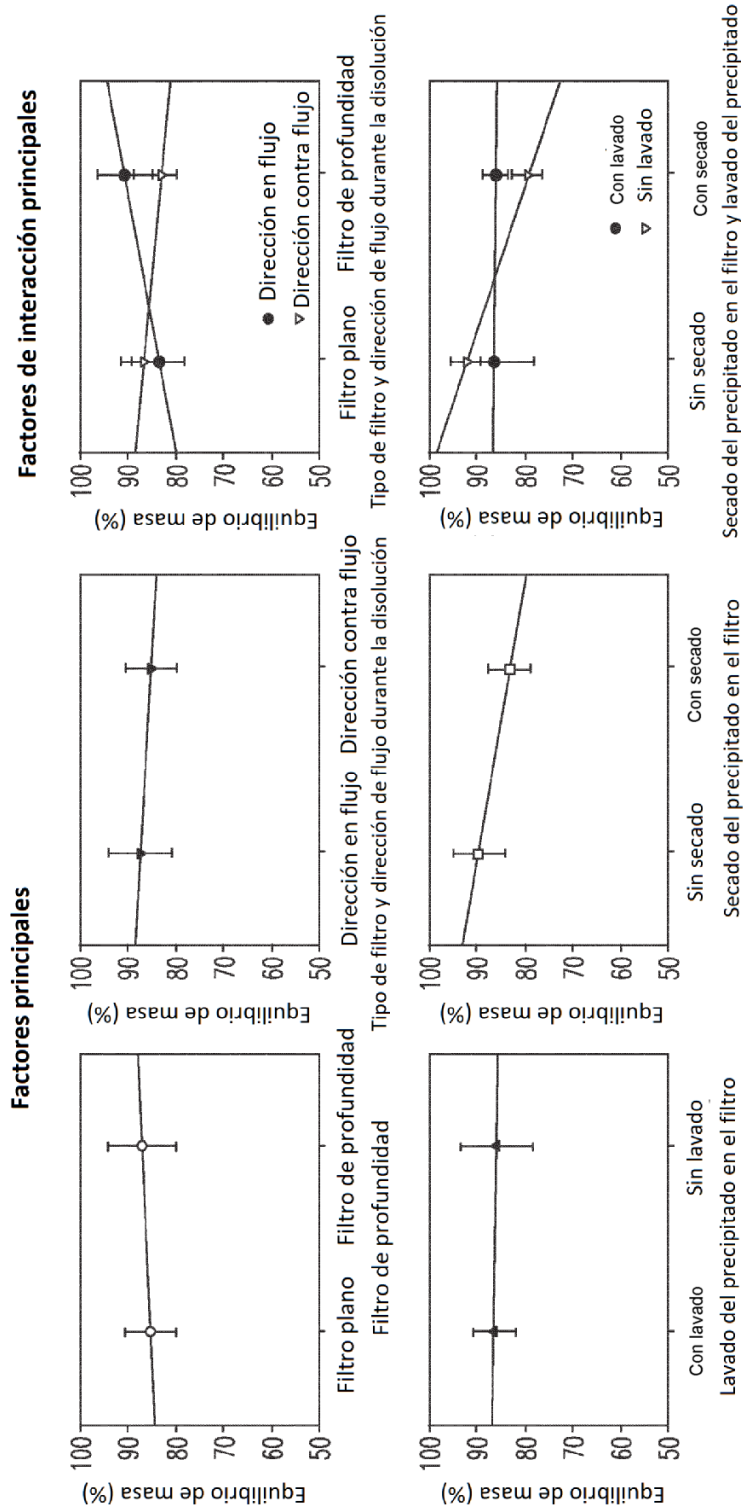


FIG.2

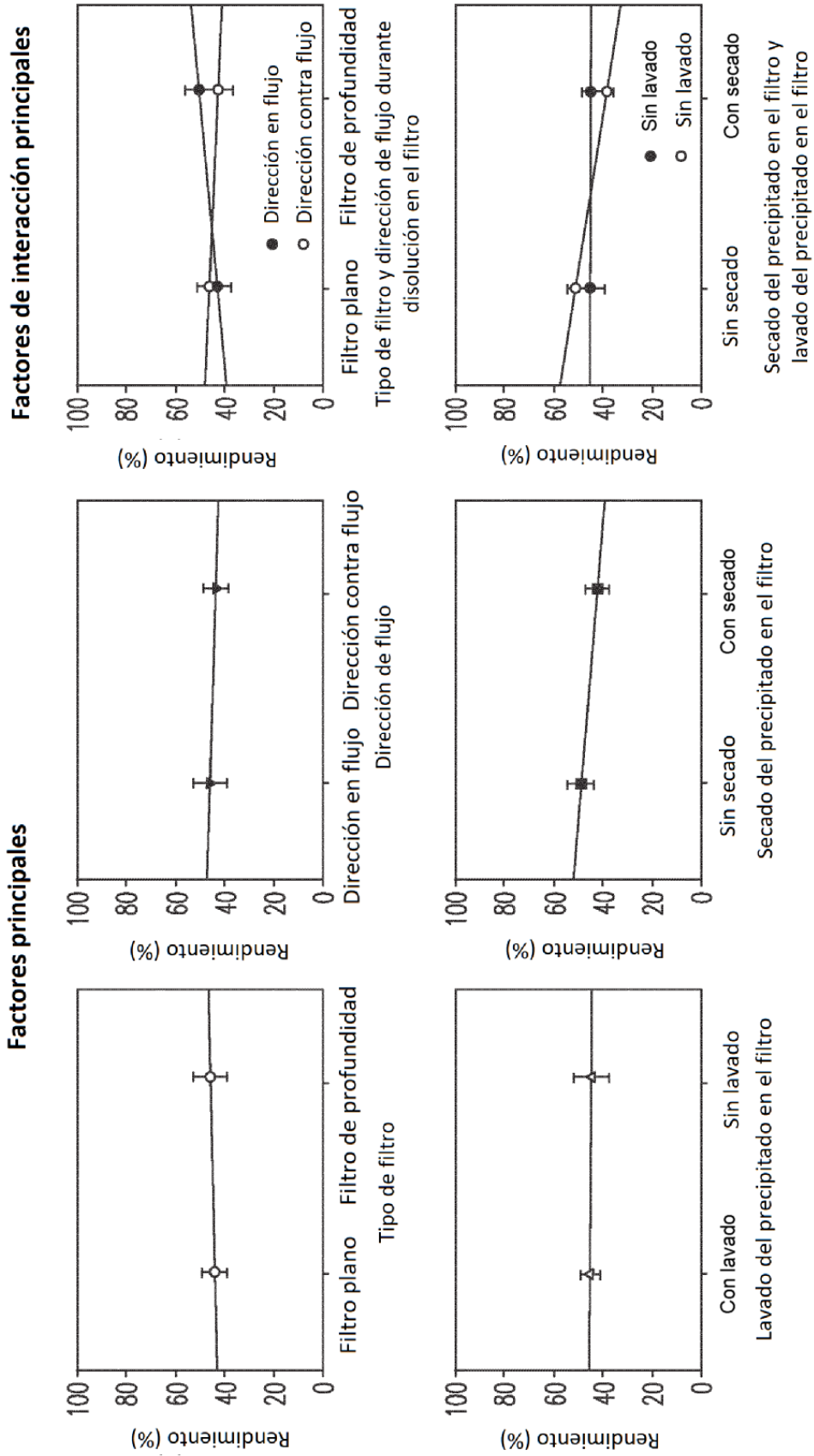


FIG.3



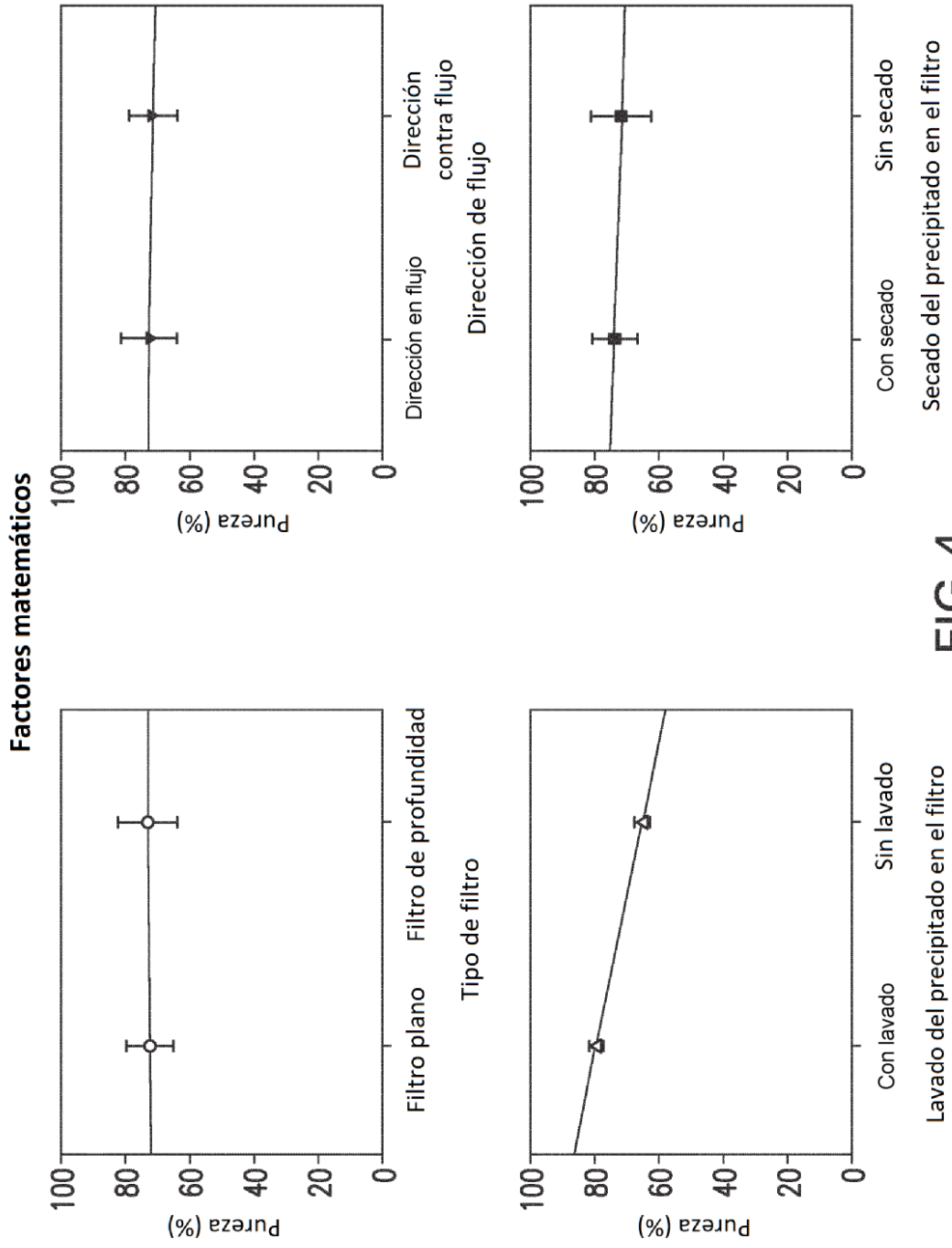
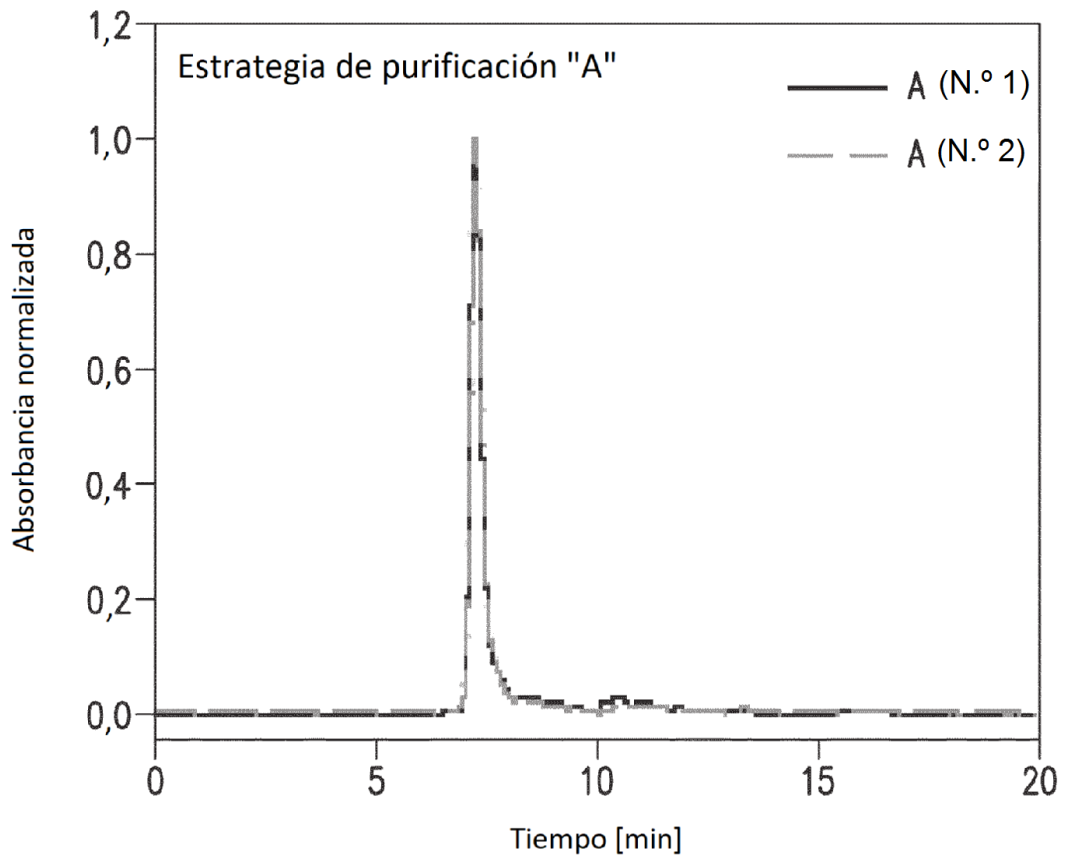
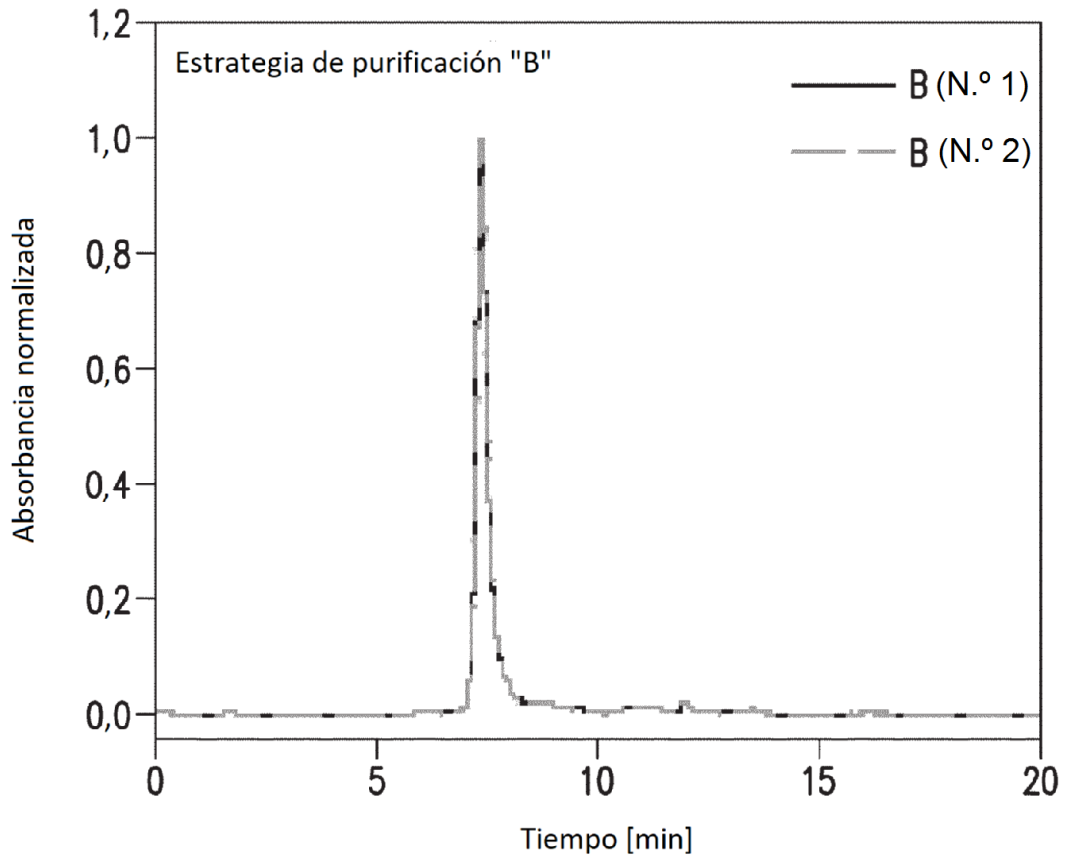


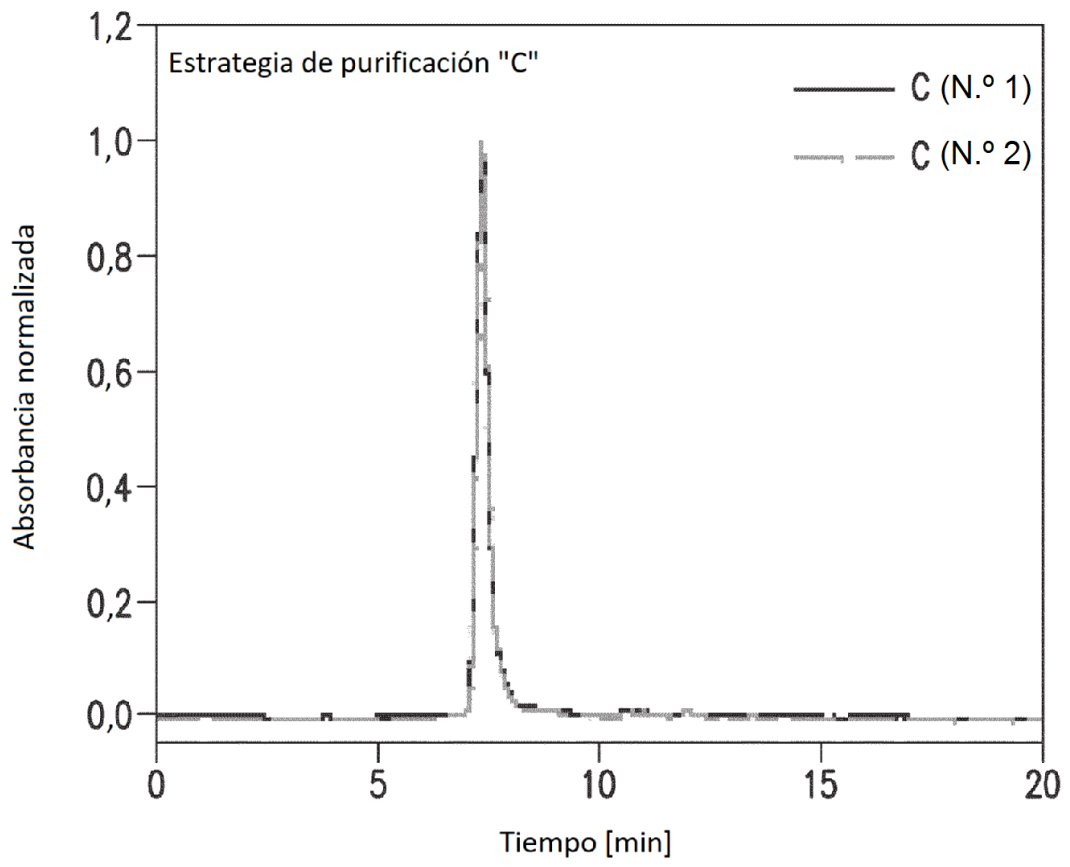
FIG.4



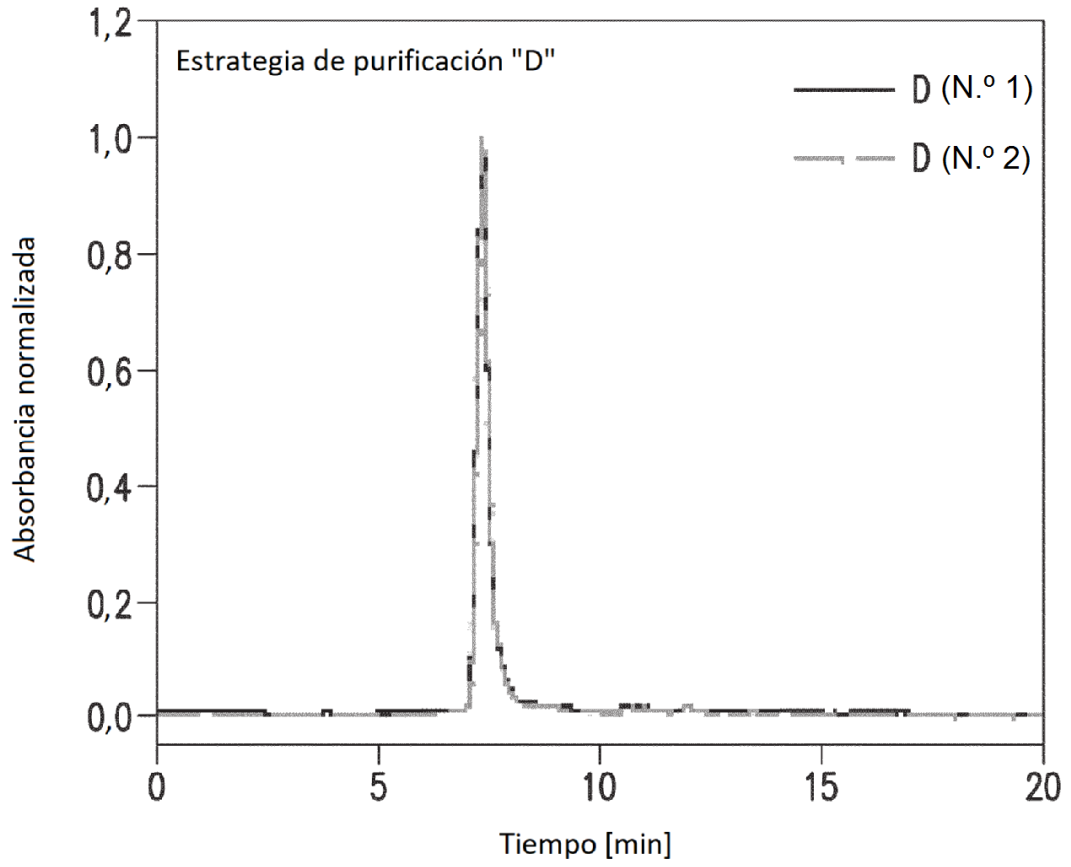
**FIG.5A**



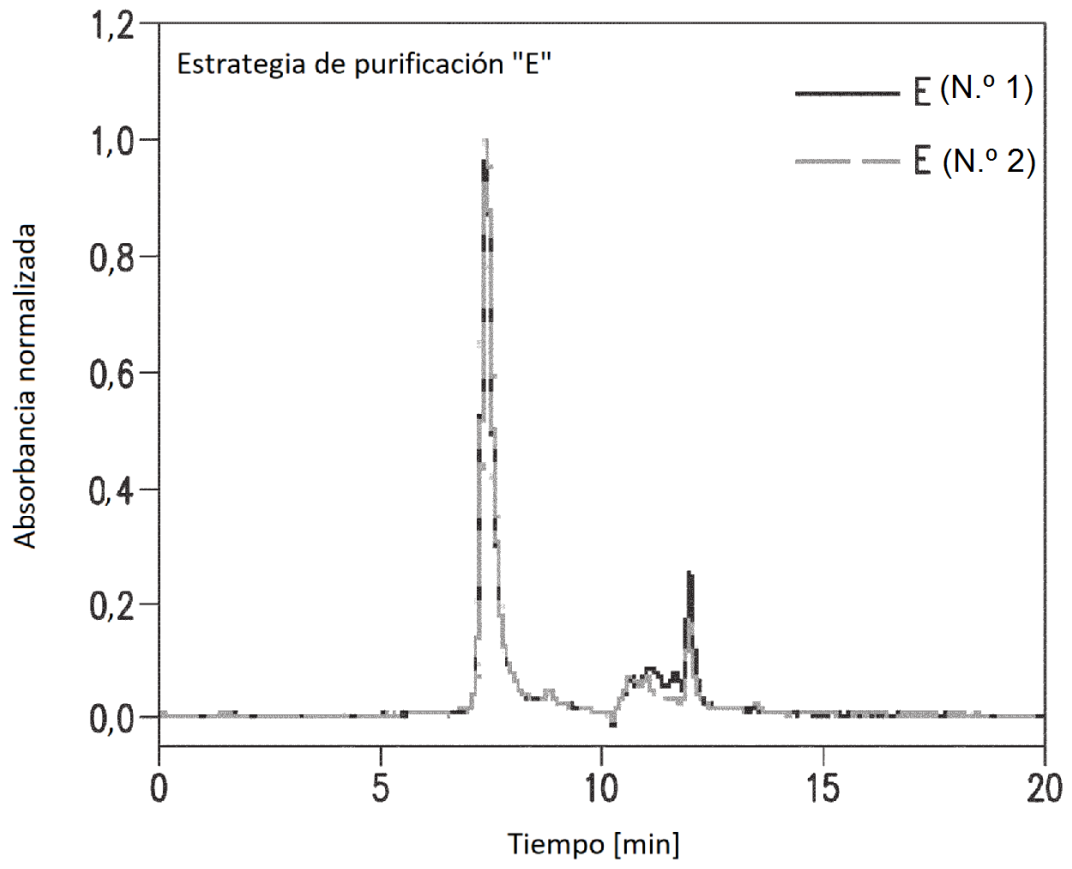
**FIG.5B**



**FIG.5C**



**FIG.5D**



**FIG.5E**

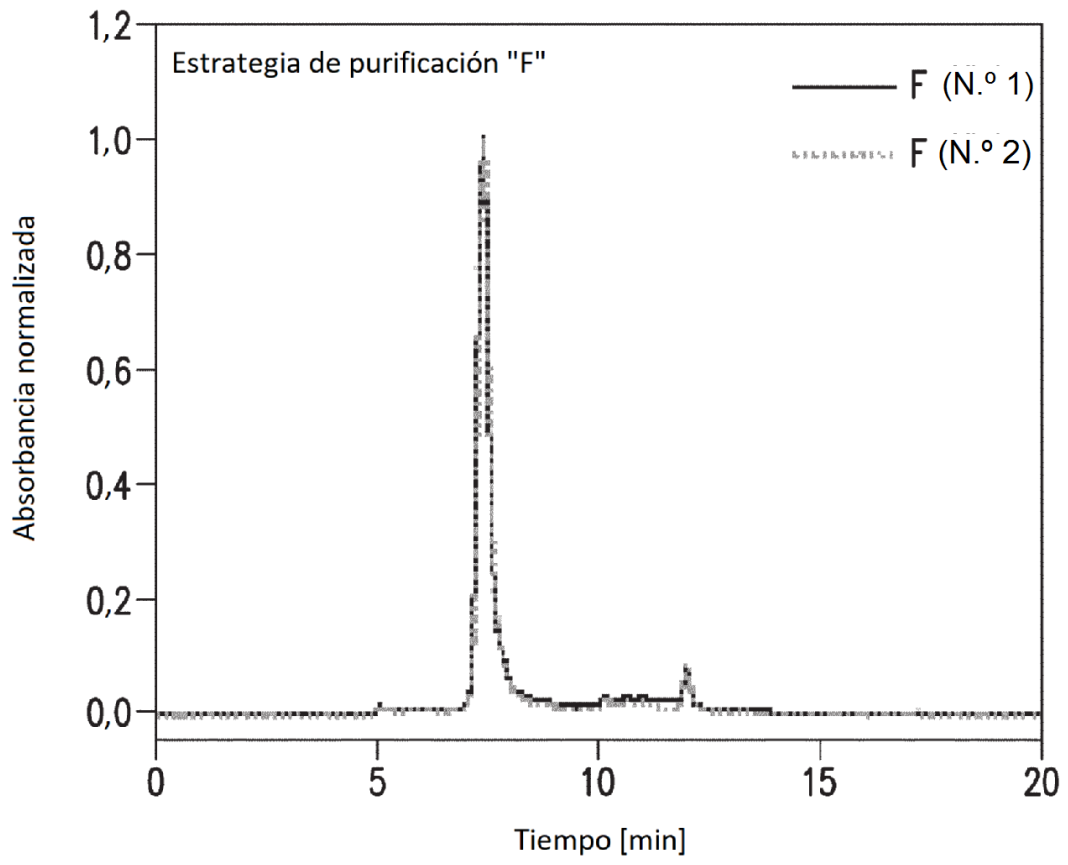


FIG.5F

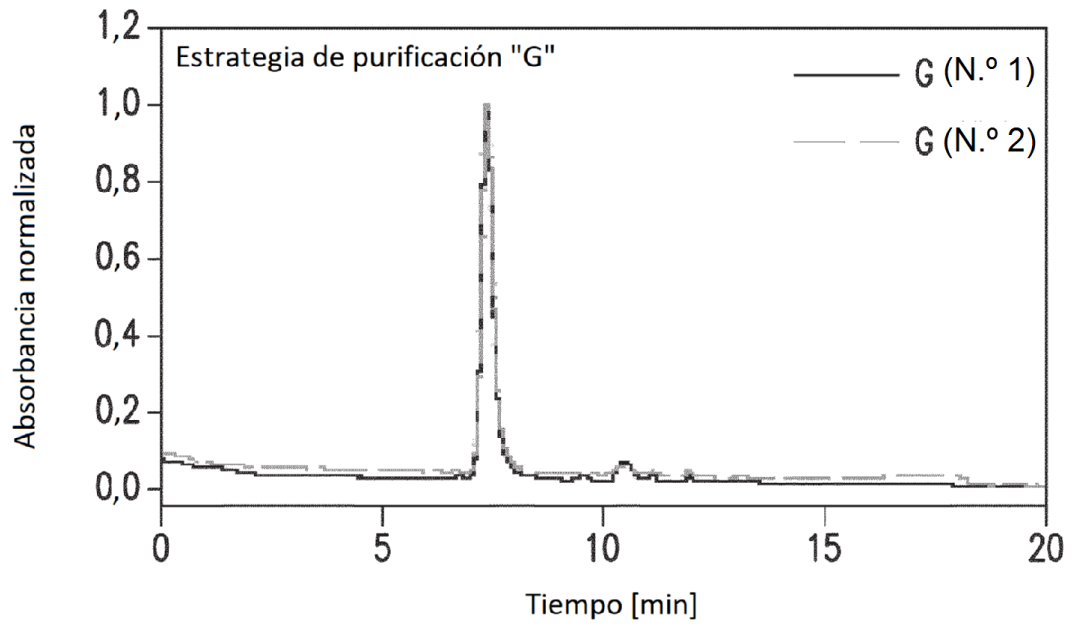


FIG.6A



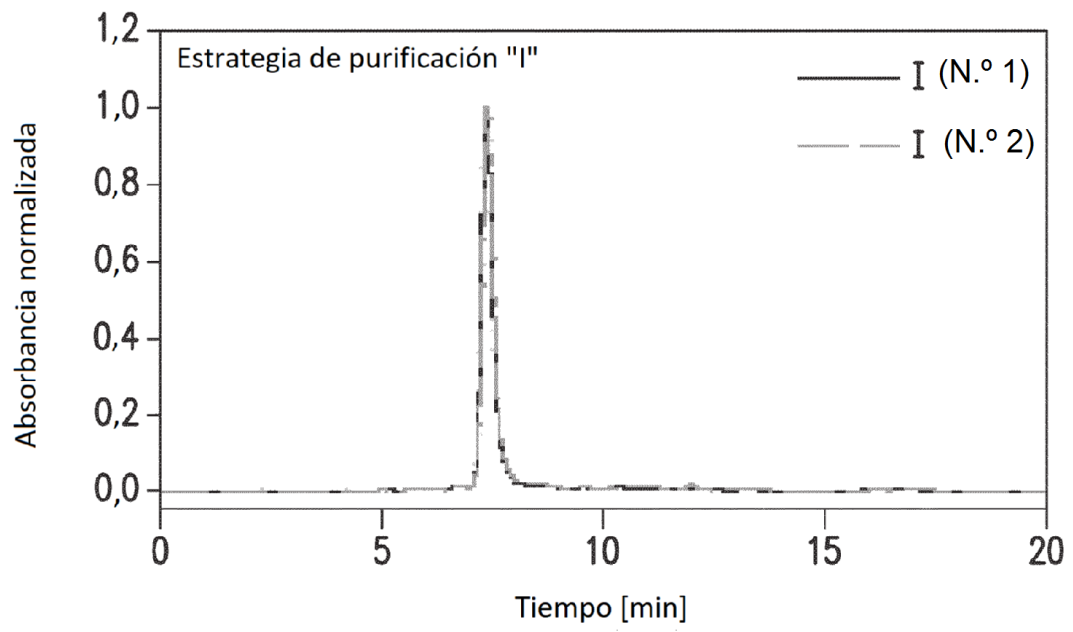
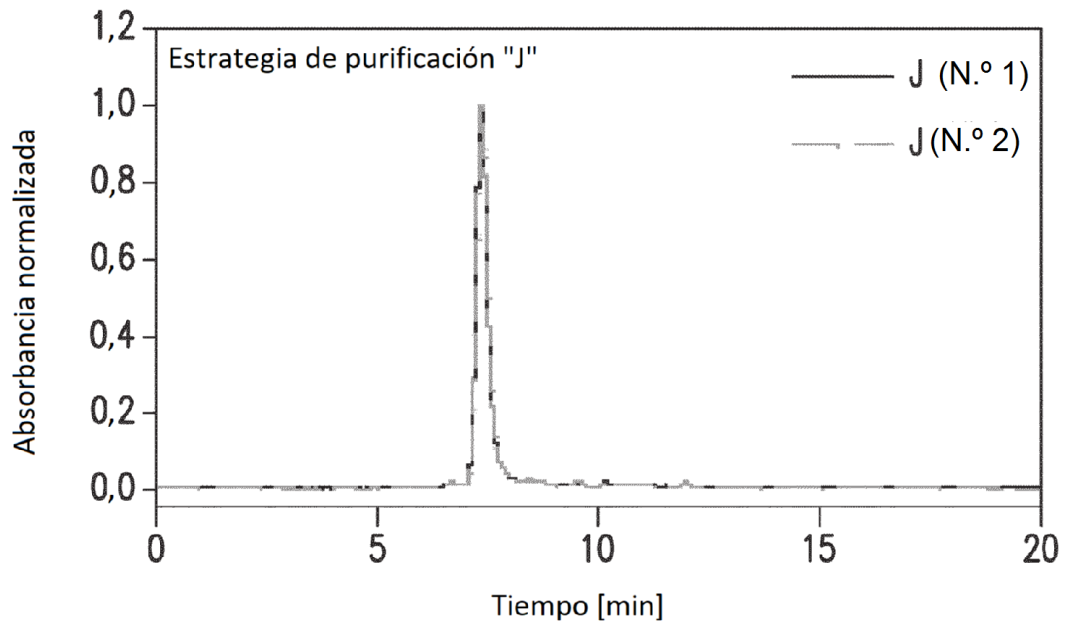
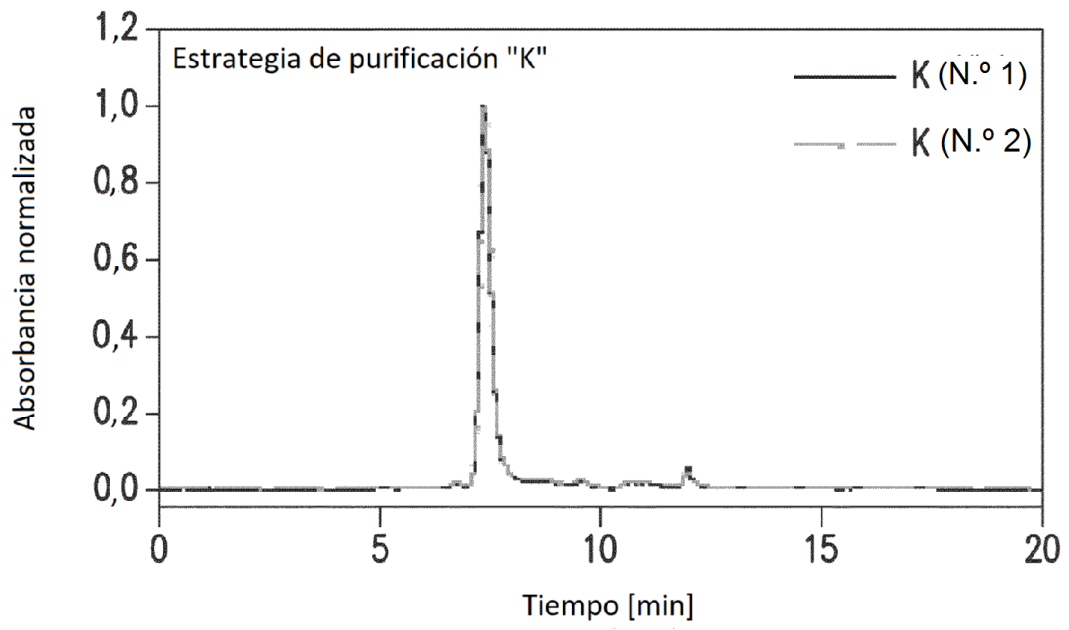


FIG.6B



**FIG.6C**



**FIG.6D**

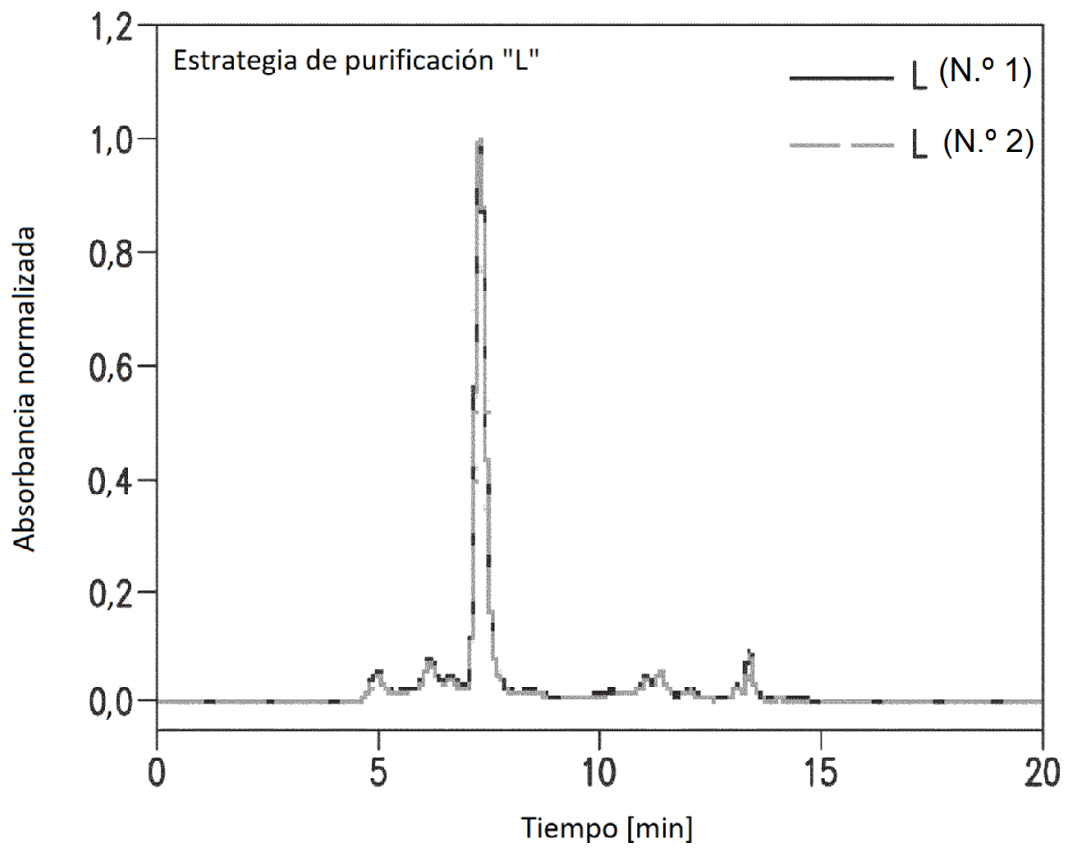
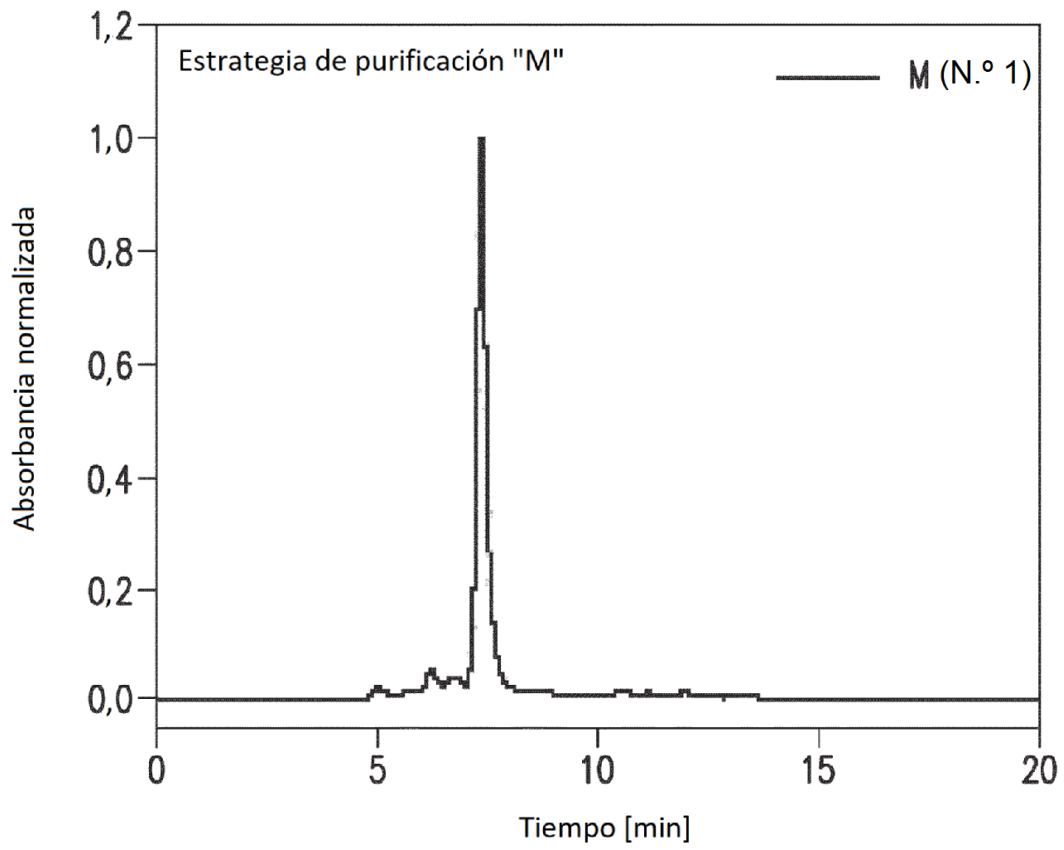
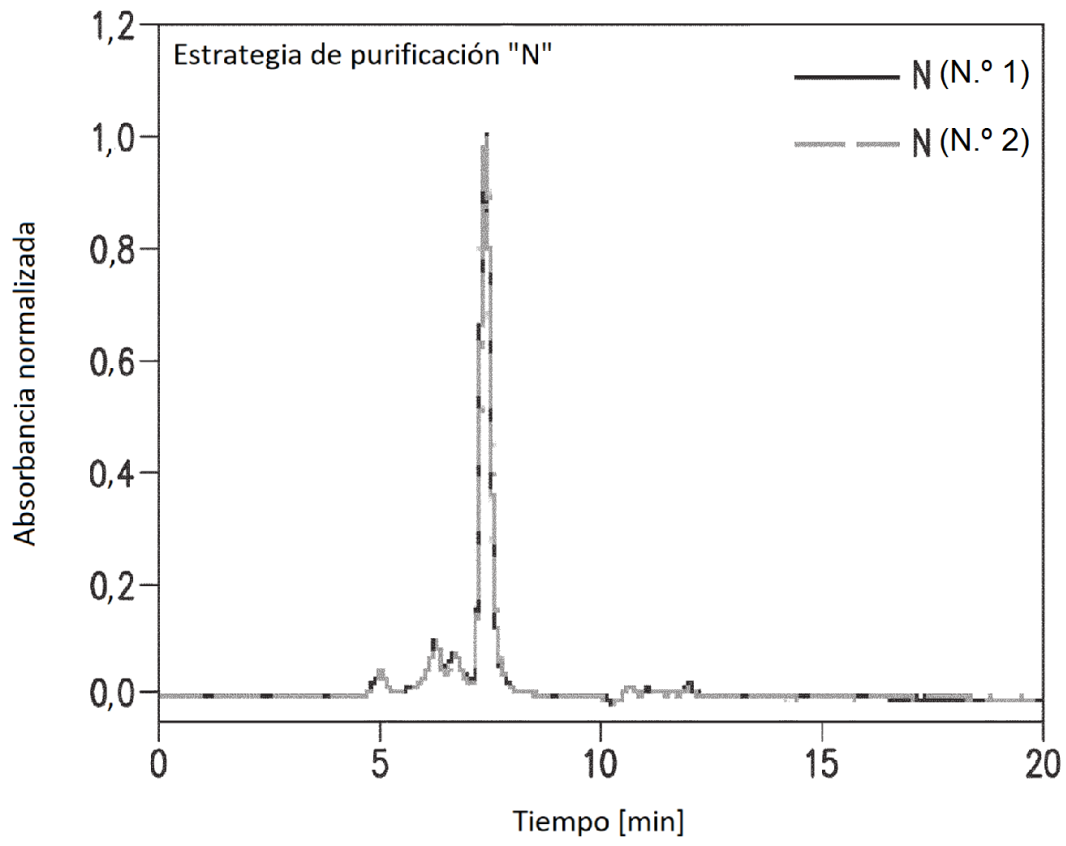


FIG.7A



**FIG. 7B**



**FIG.7C**

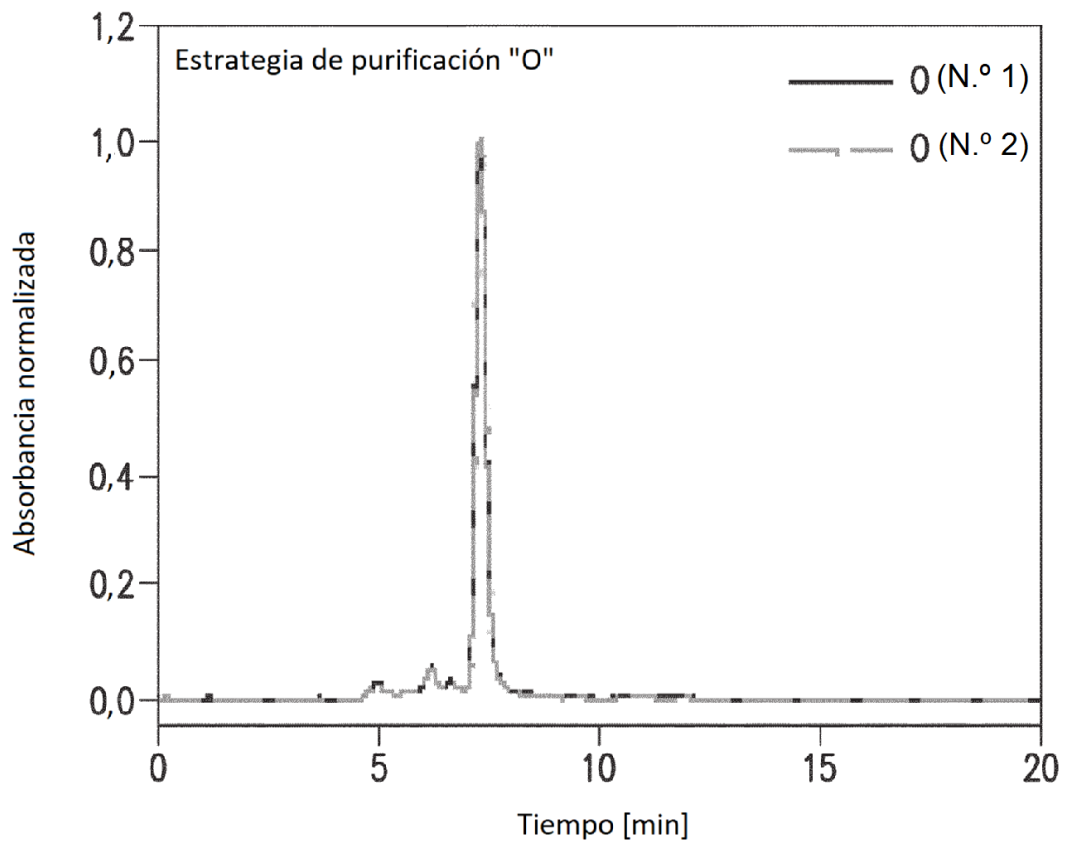
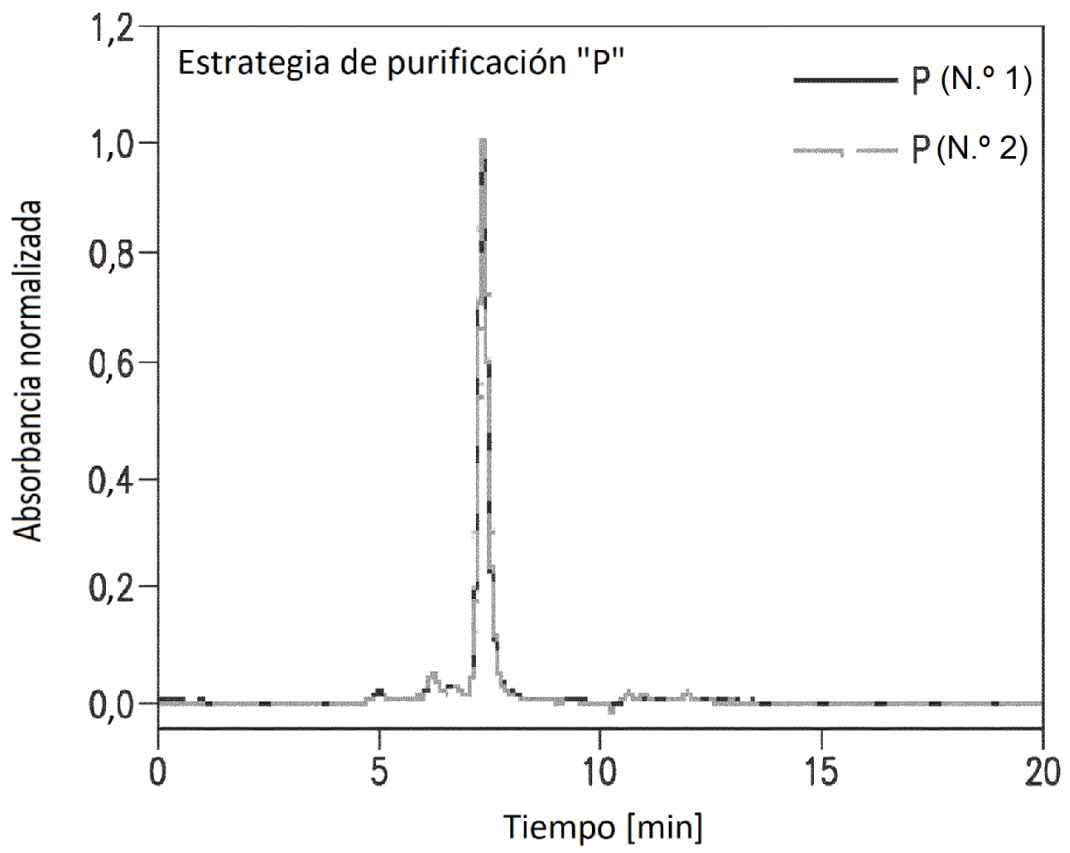


FIG.7D



**FIG.7E**



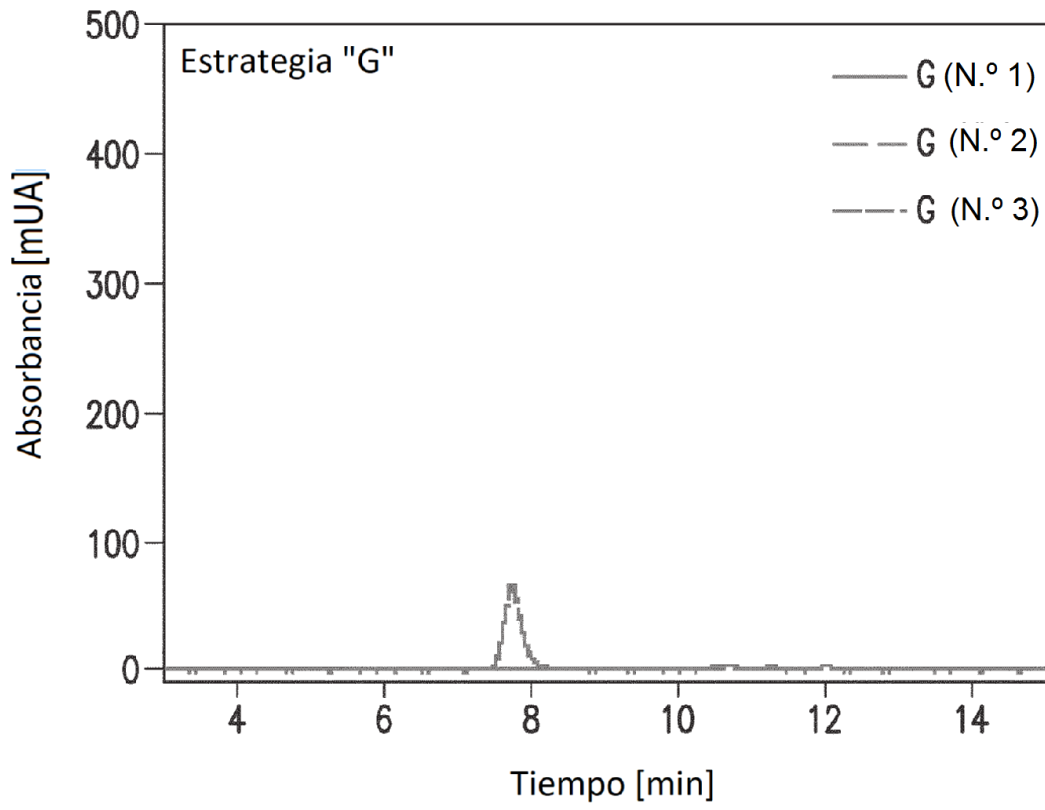
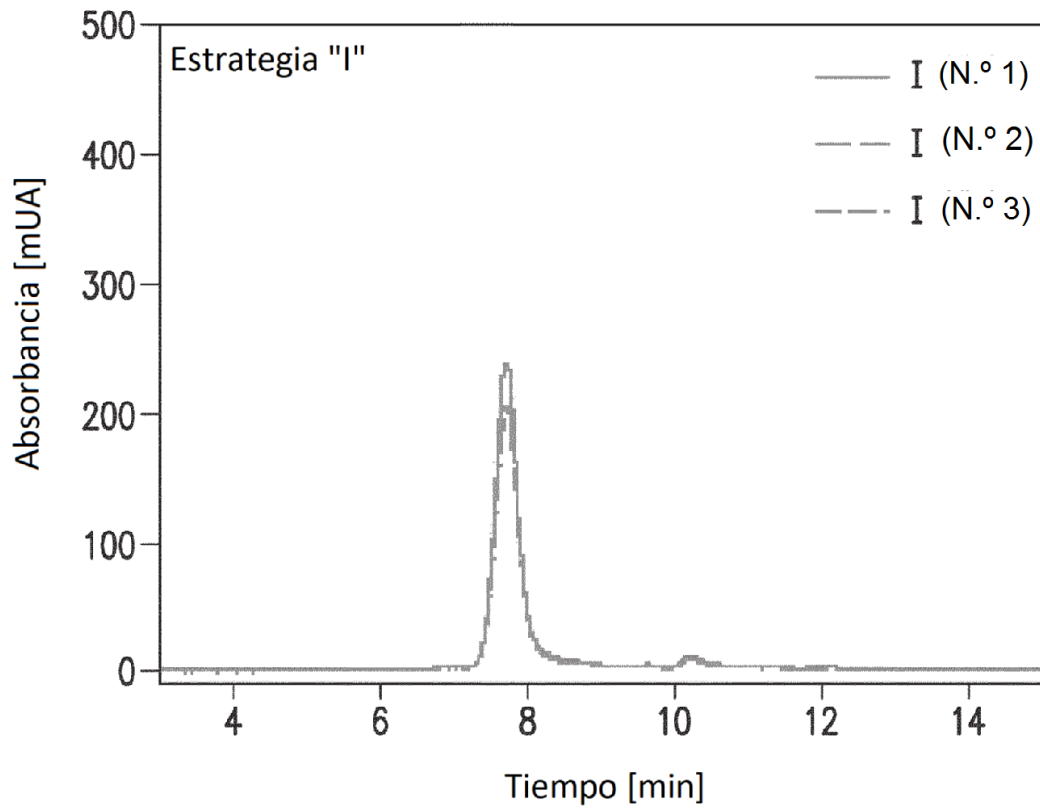
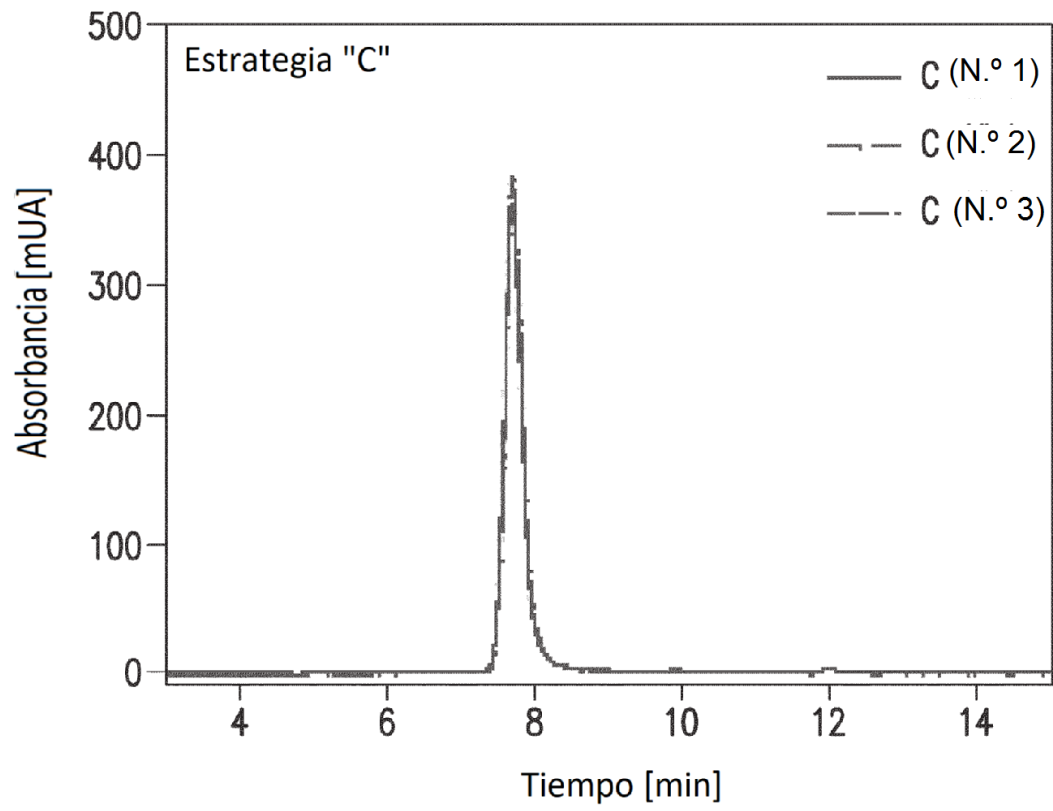


FIG.8A



**FIG.8B**



**FIG.8C**

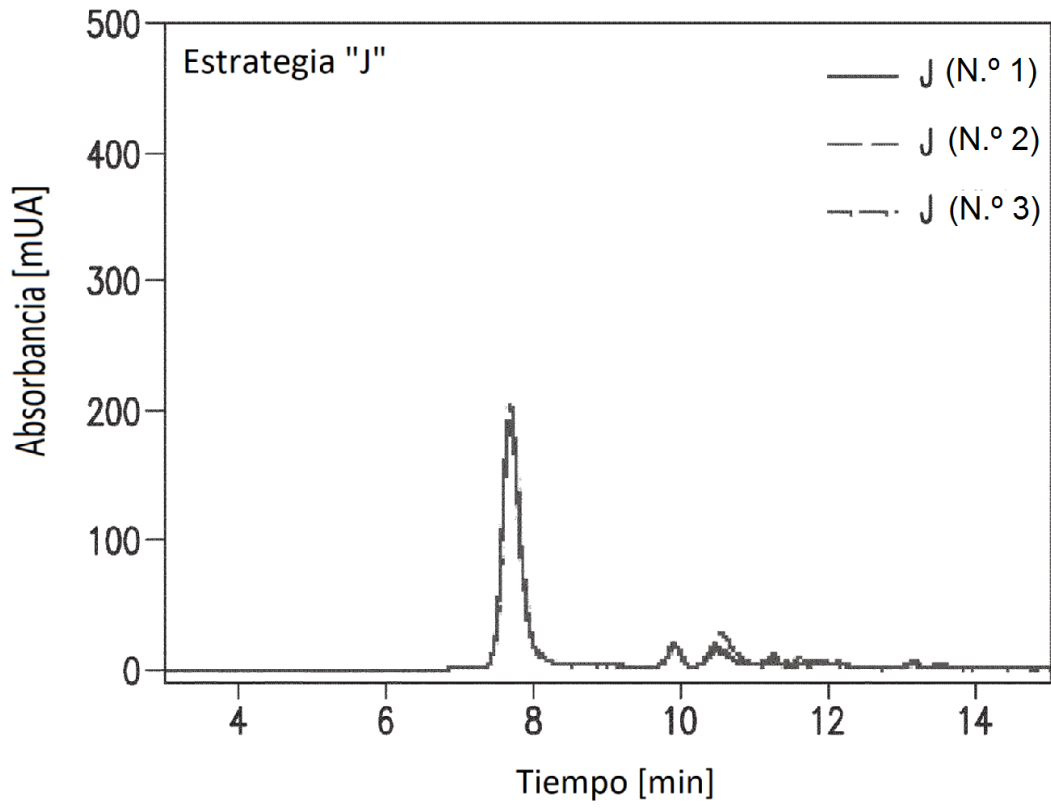
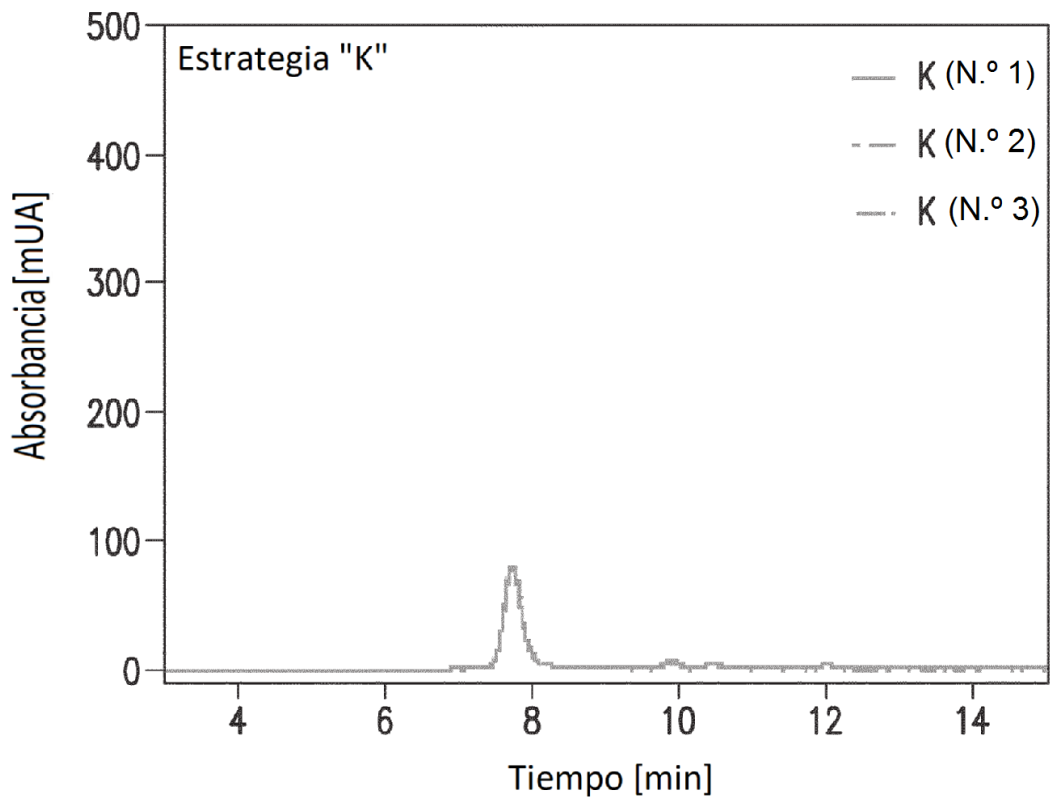
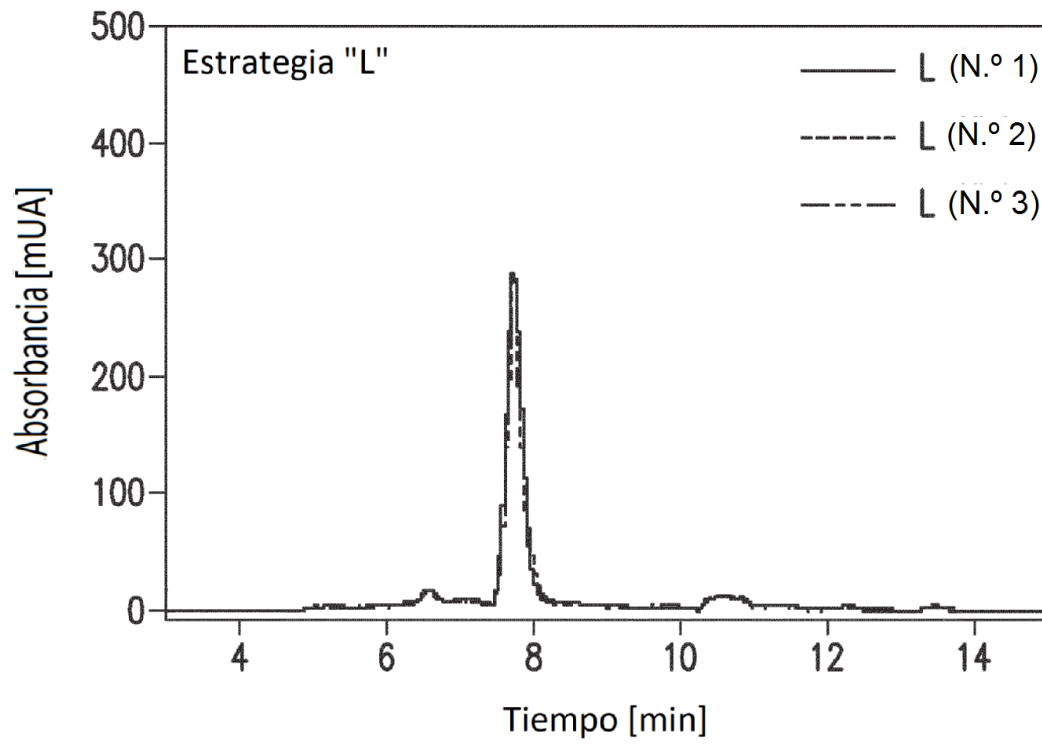


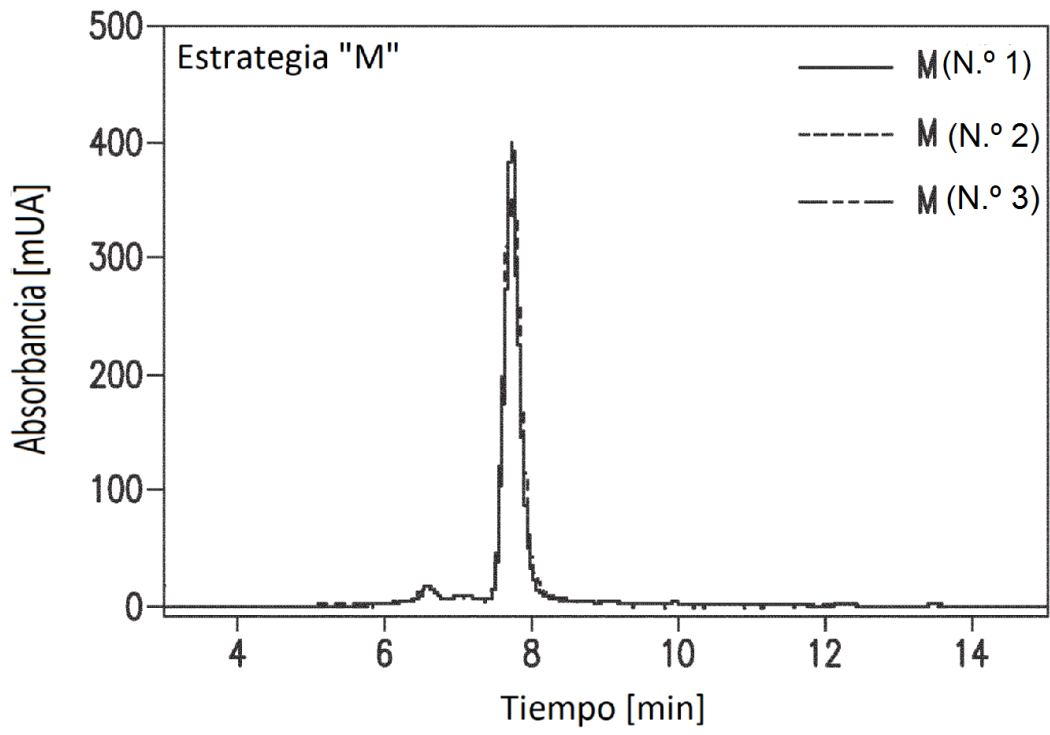
FIG.8D



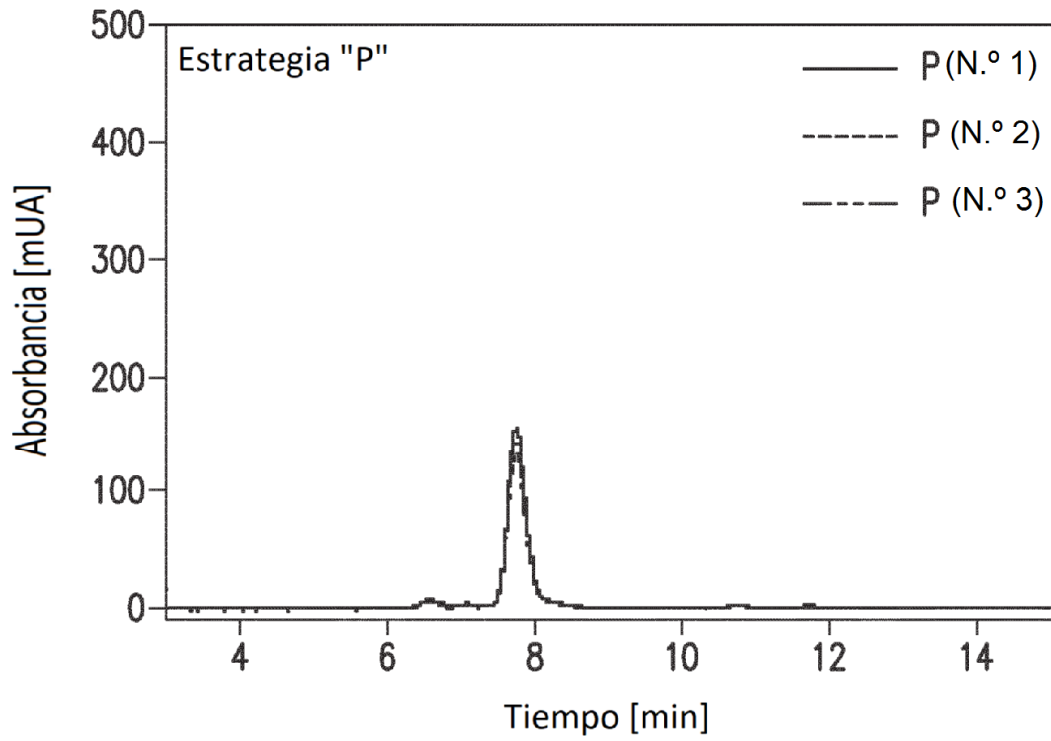
**FIG.8E**



**FIG.9A**

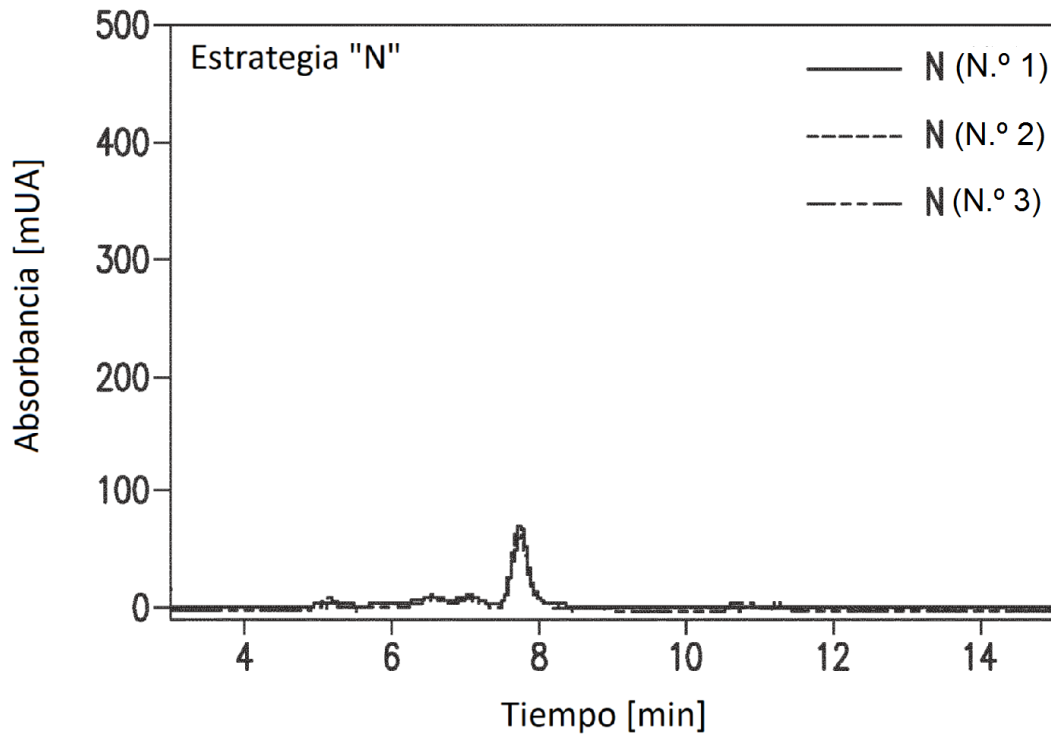


**FIG.9B**



**FIG.9C**





**FIG.9D**

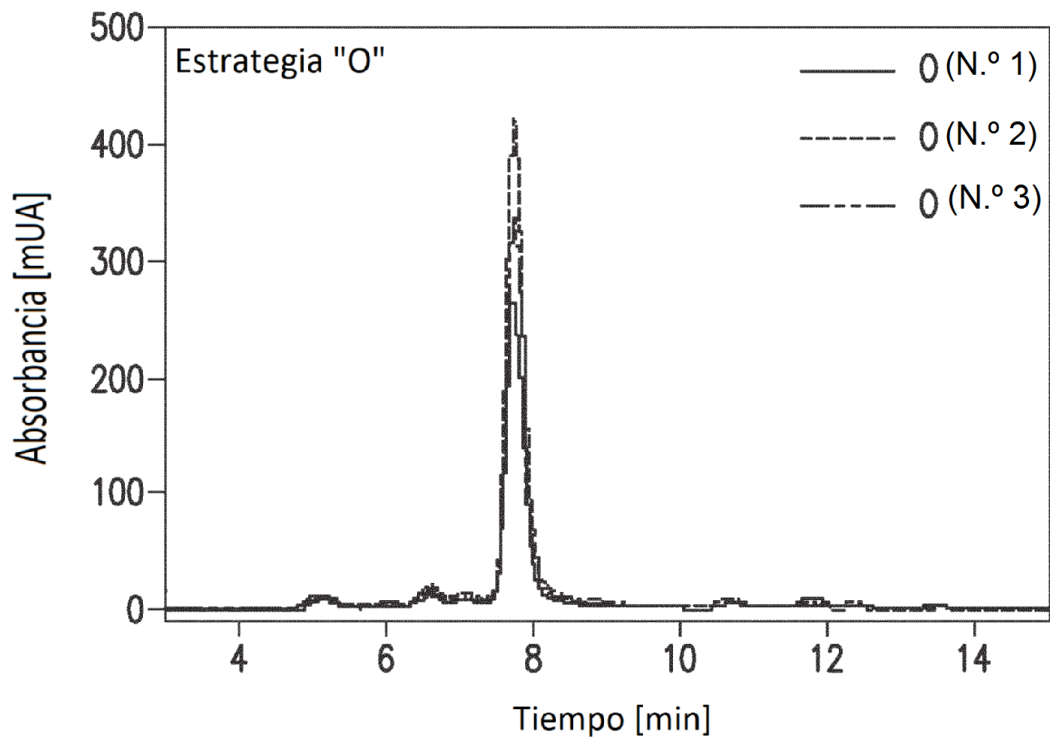
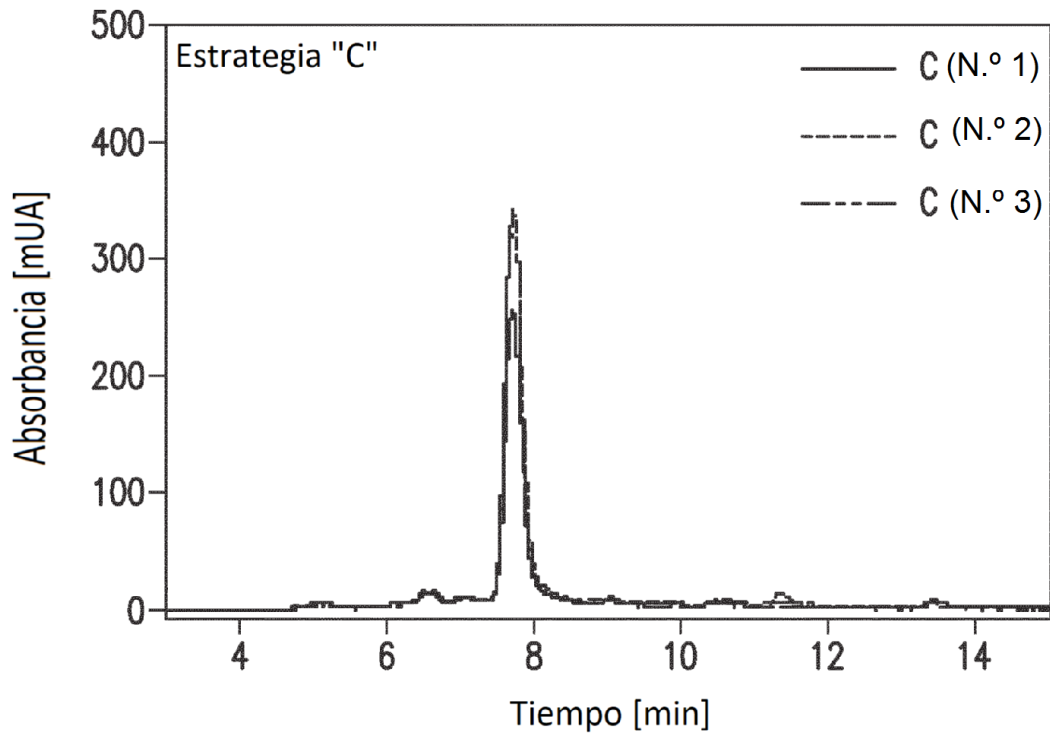
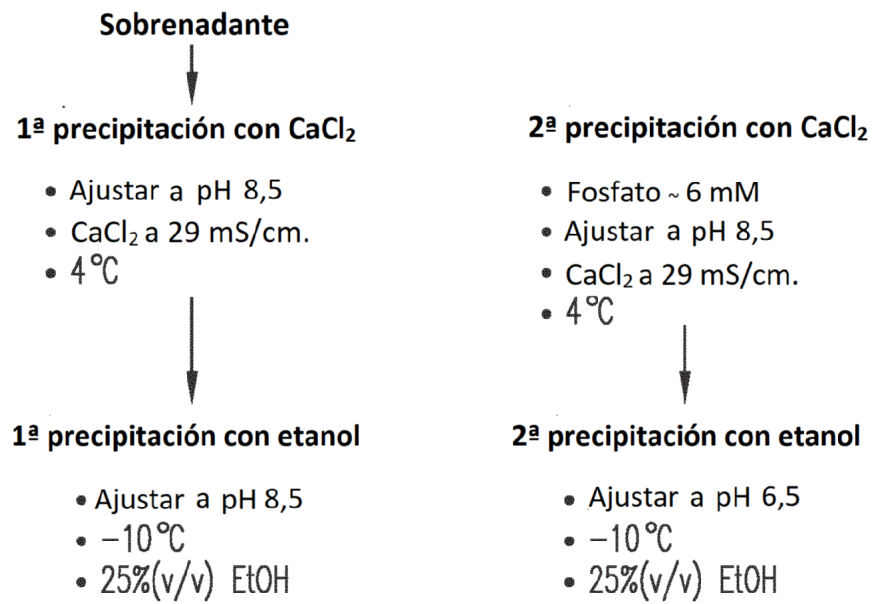


FIG.9E



**FIG.9F**



**FIG.10**

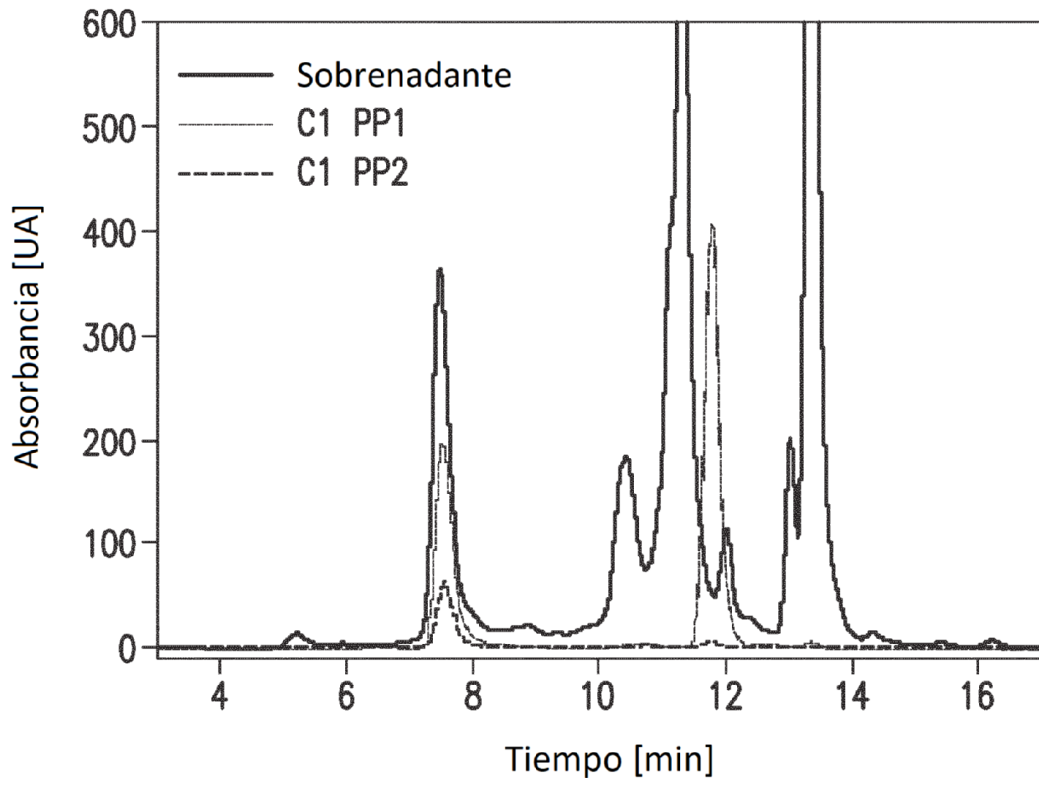
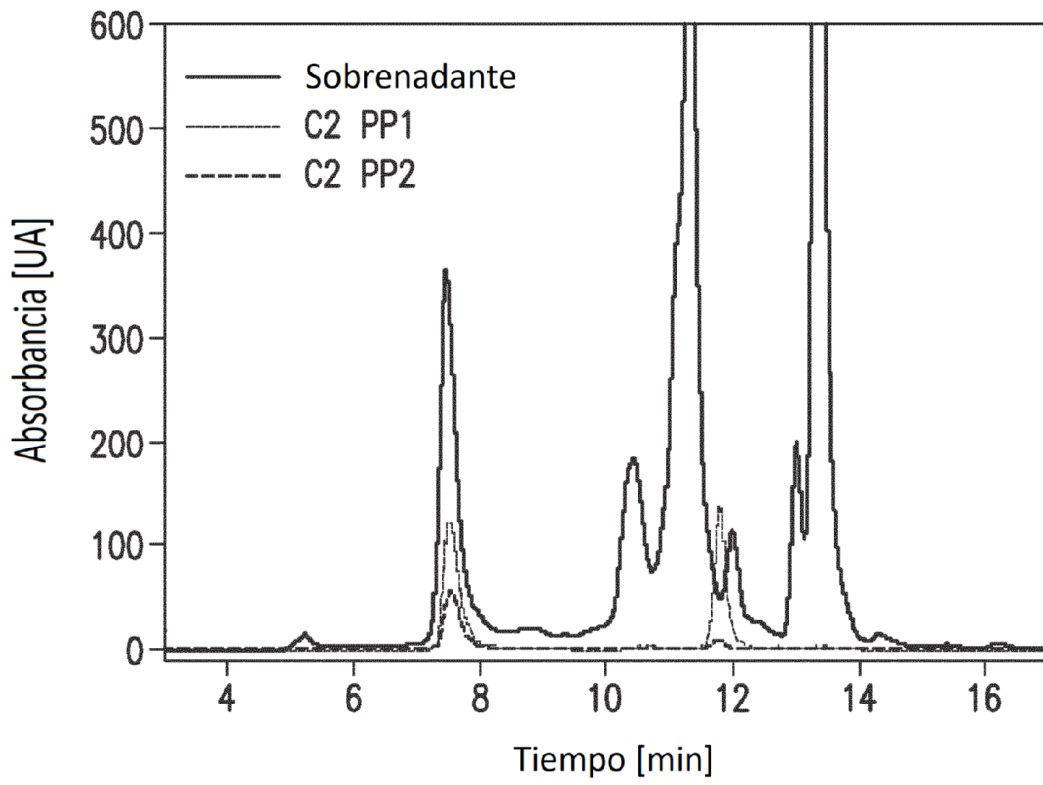
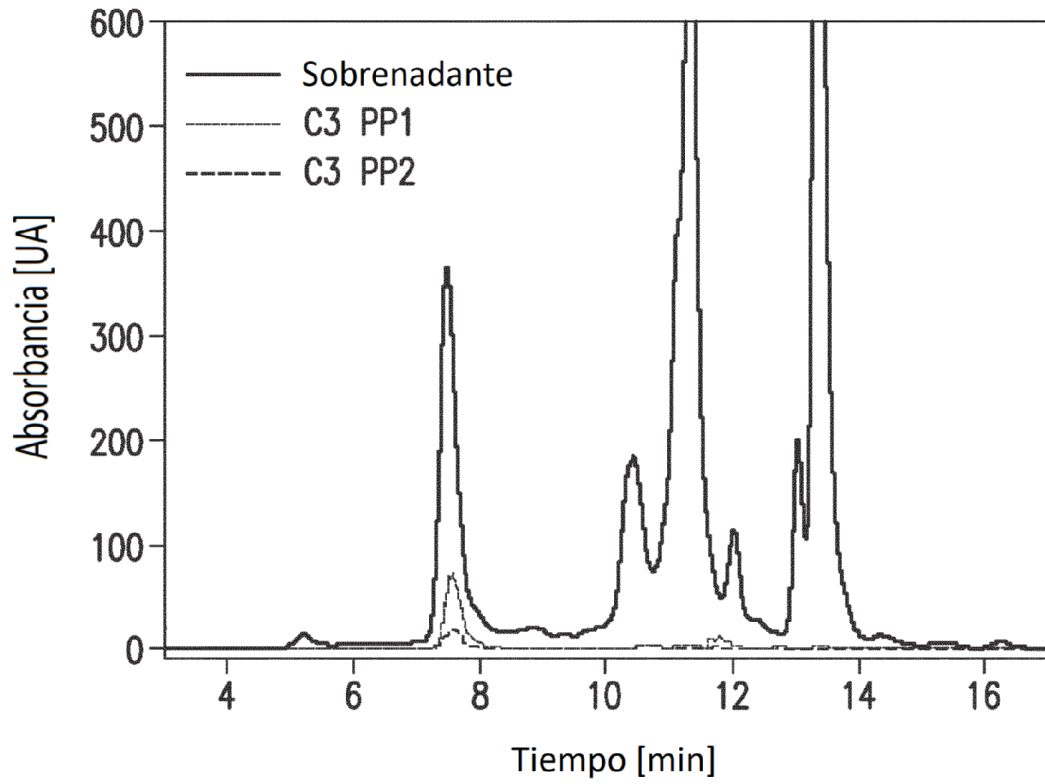


FIG.11A



**FIG. 11B**



**FIG. 11C**

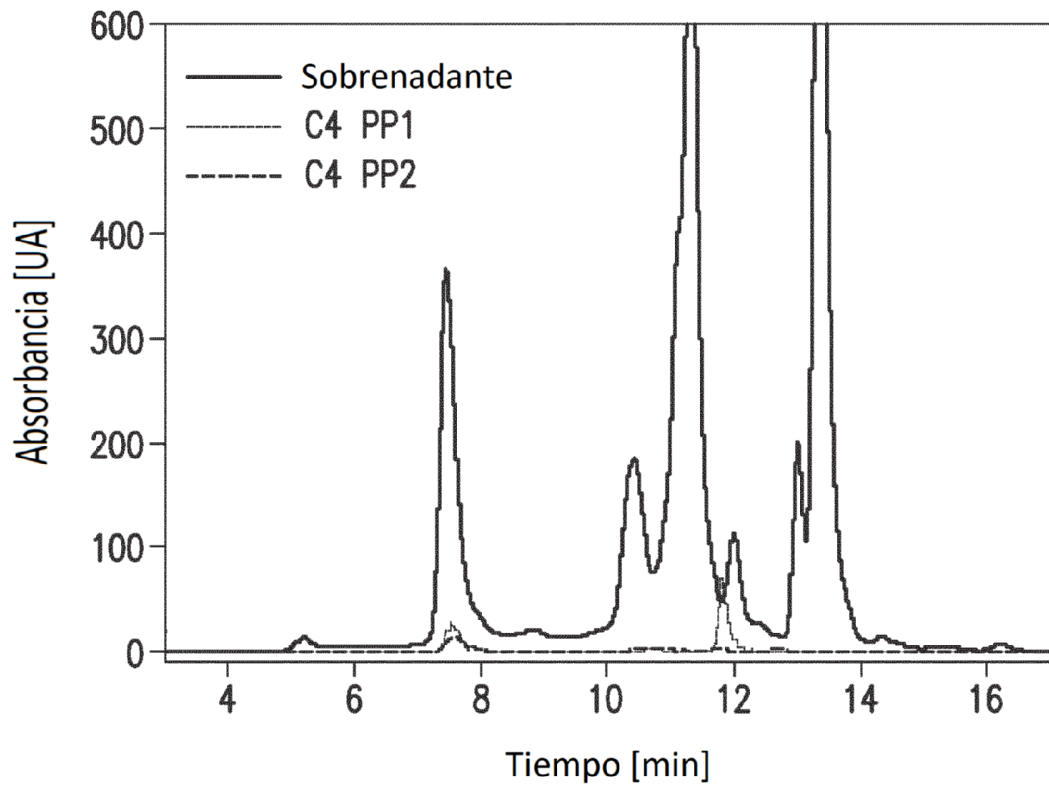
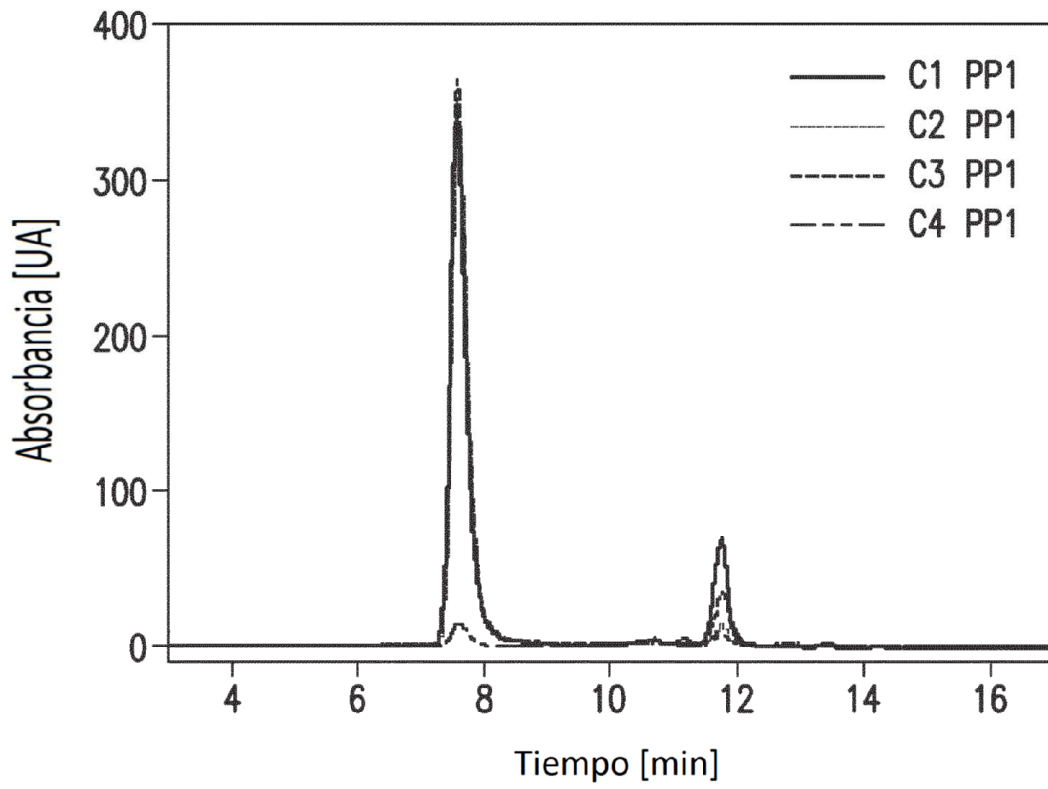
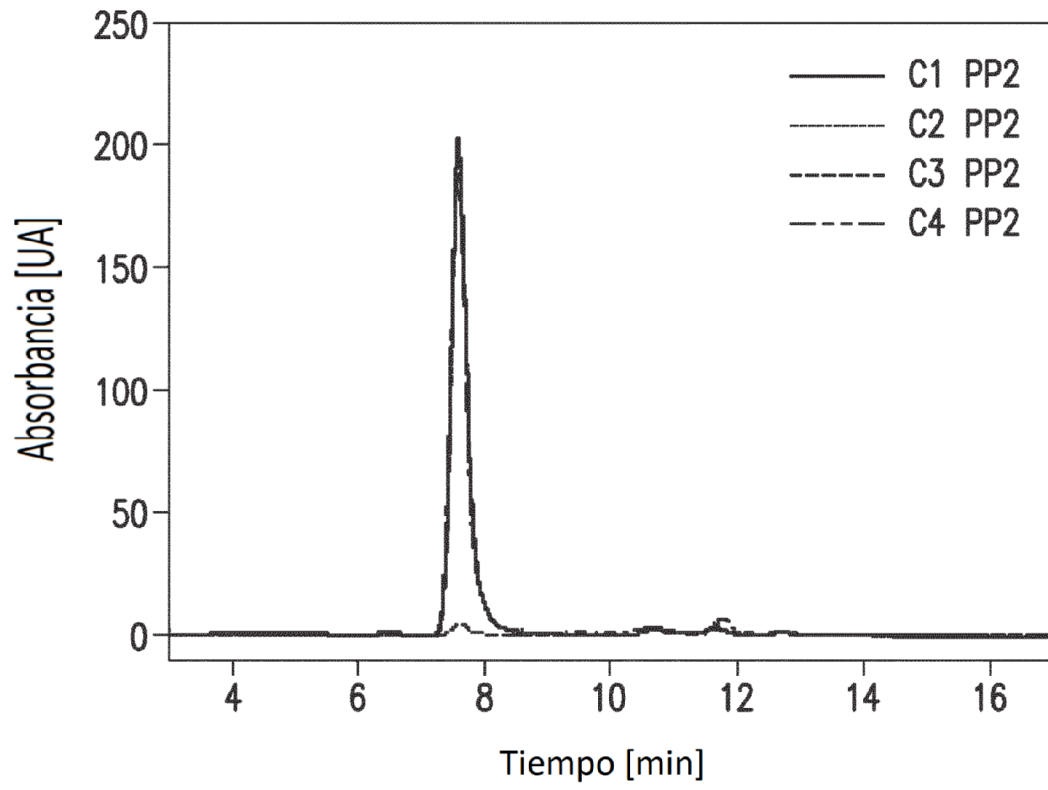


FIG.11D

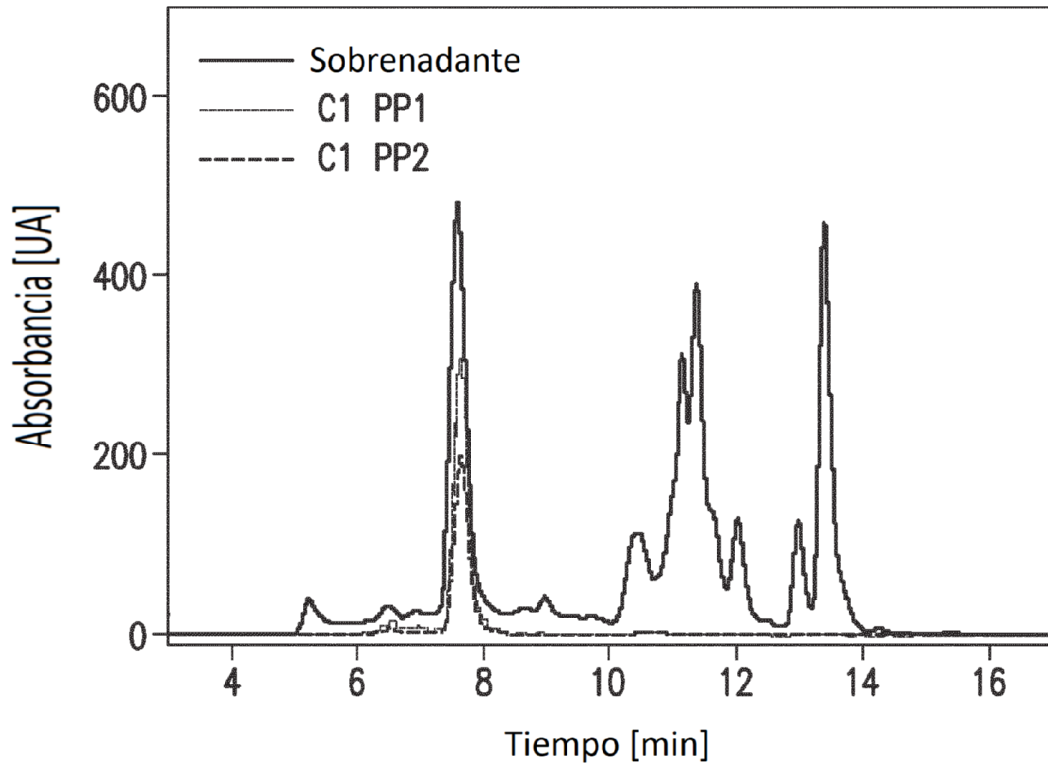




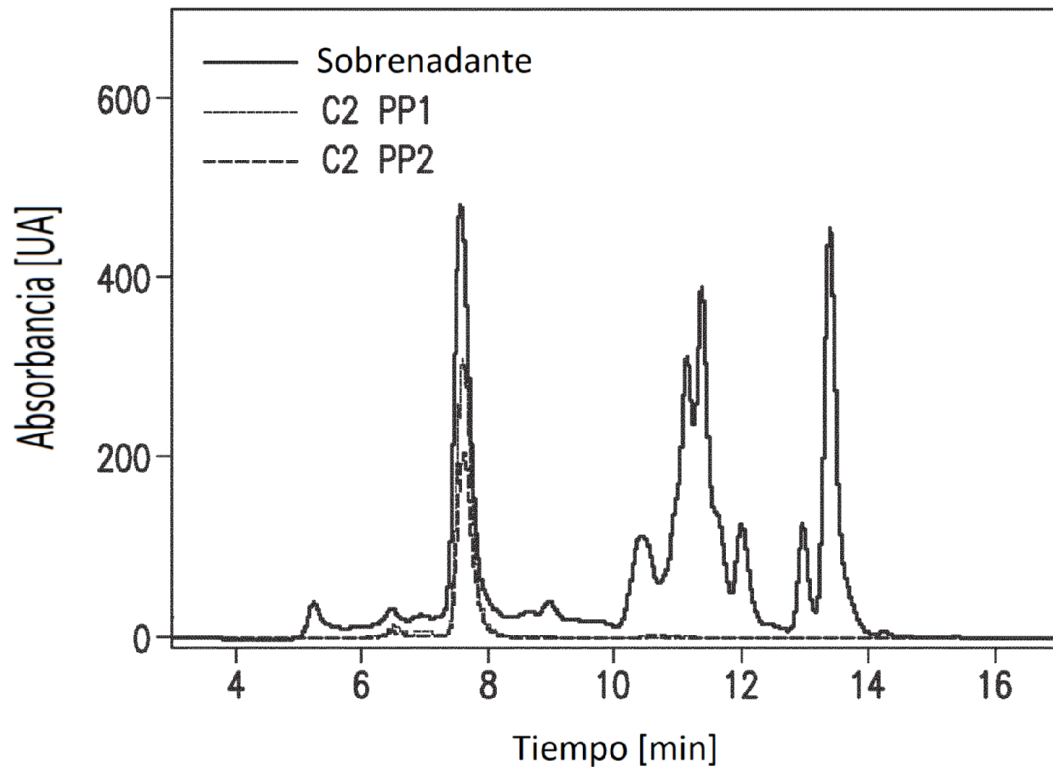
**FIG. 12A**



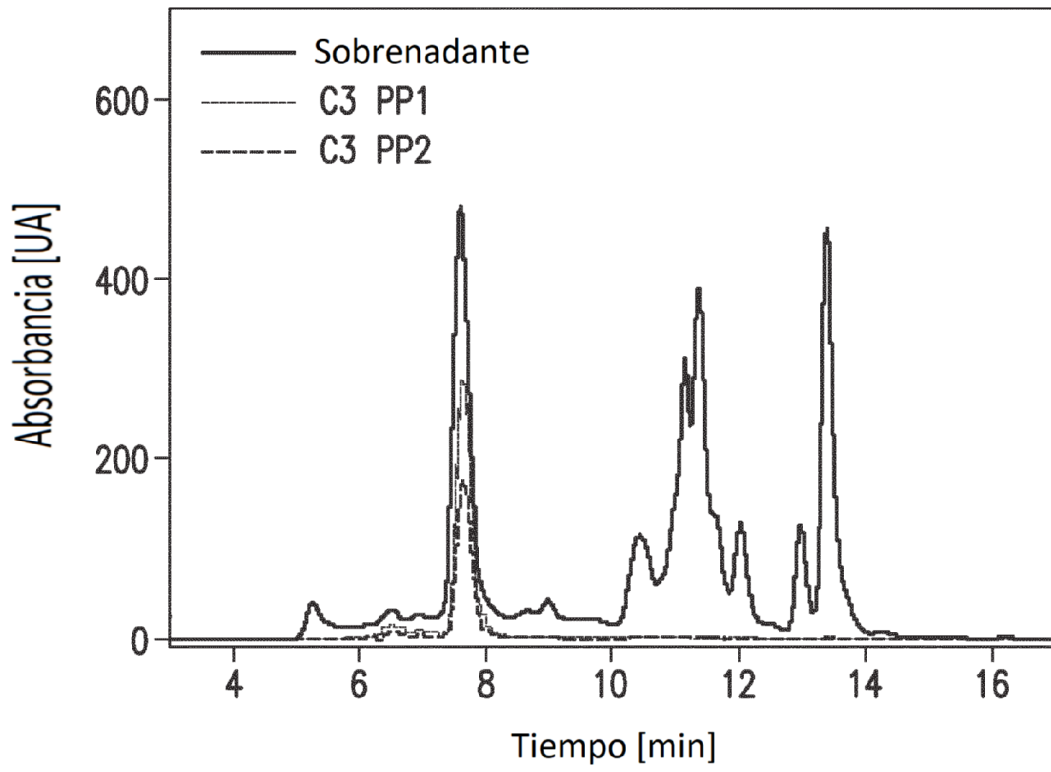
**FIG. 12B**



**FIG.13A**



**FIG. 13B**



**FIG.13C**

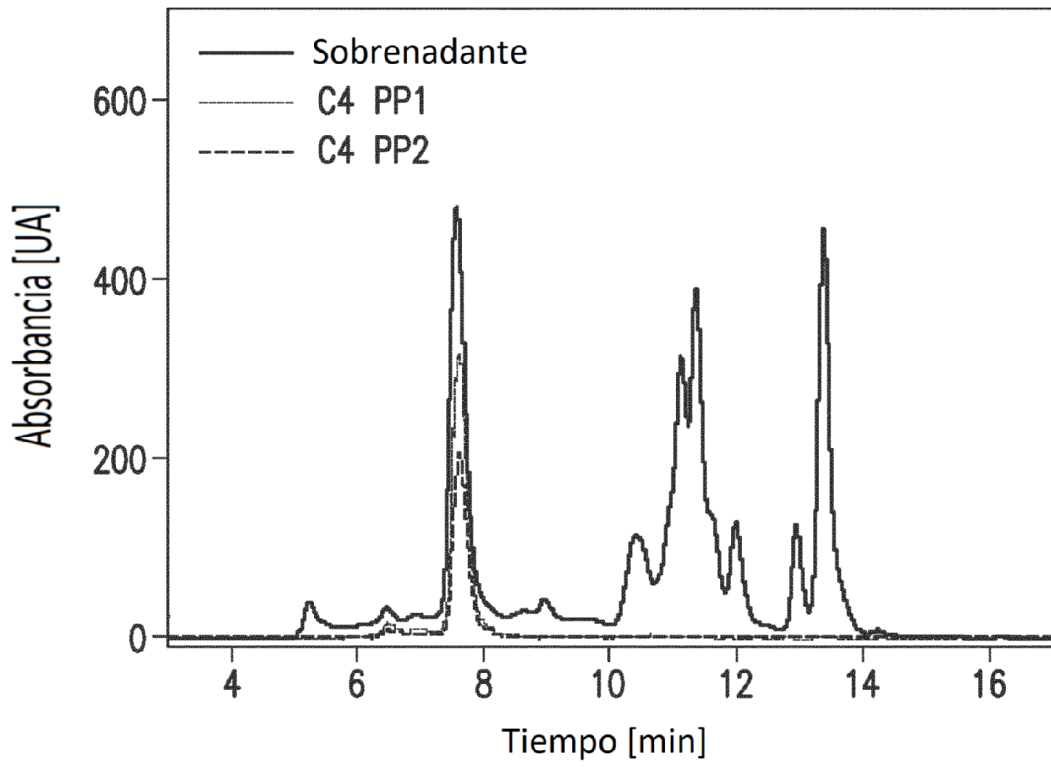


FIG. 13D

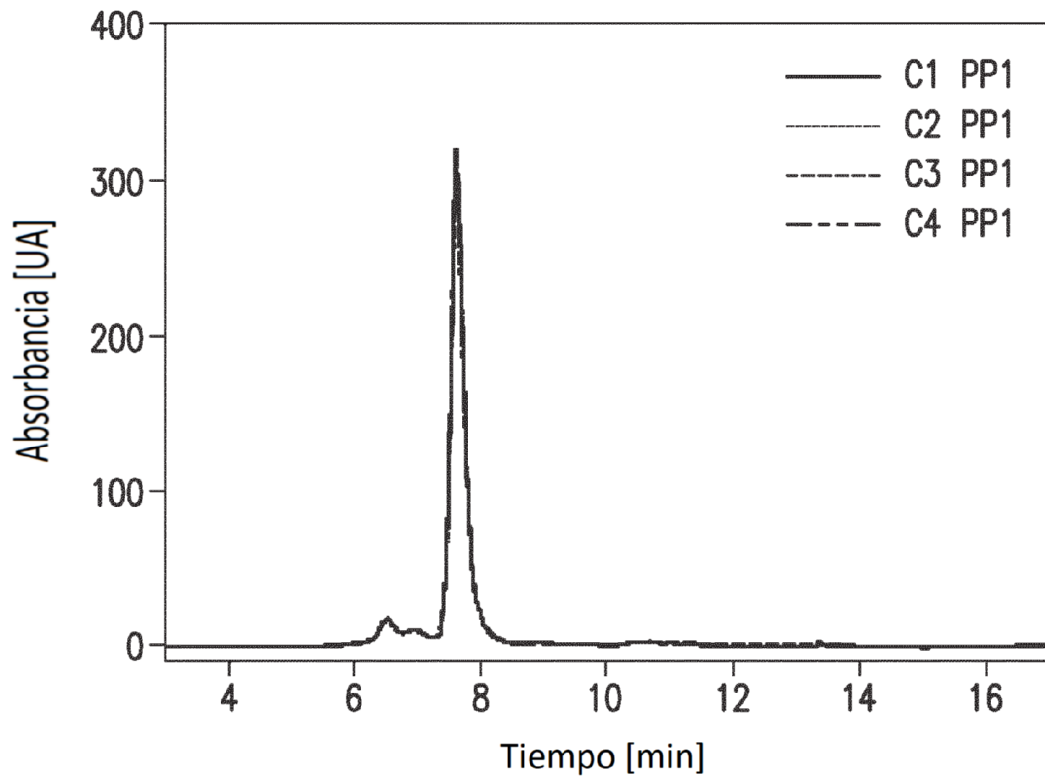
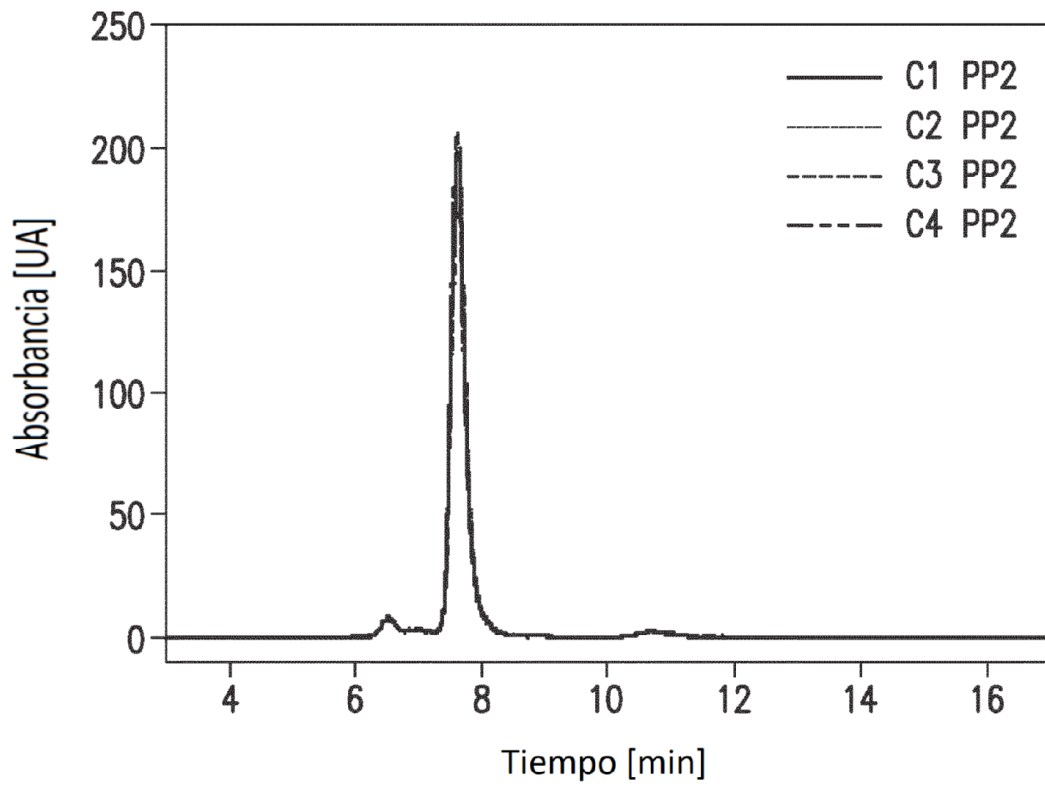
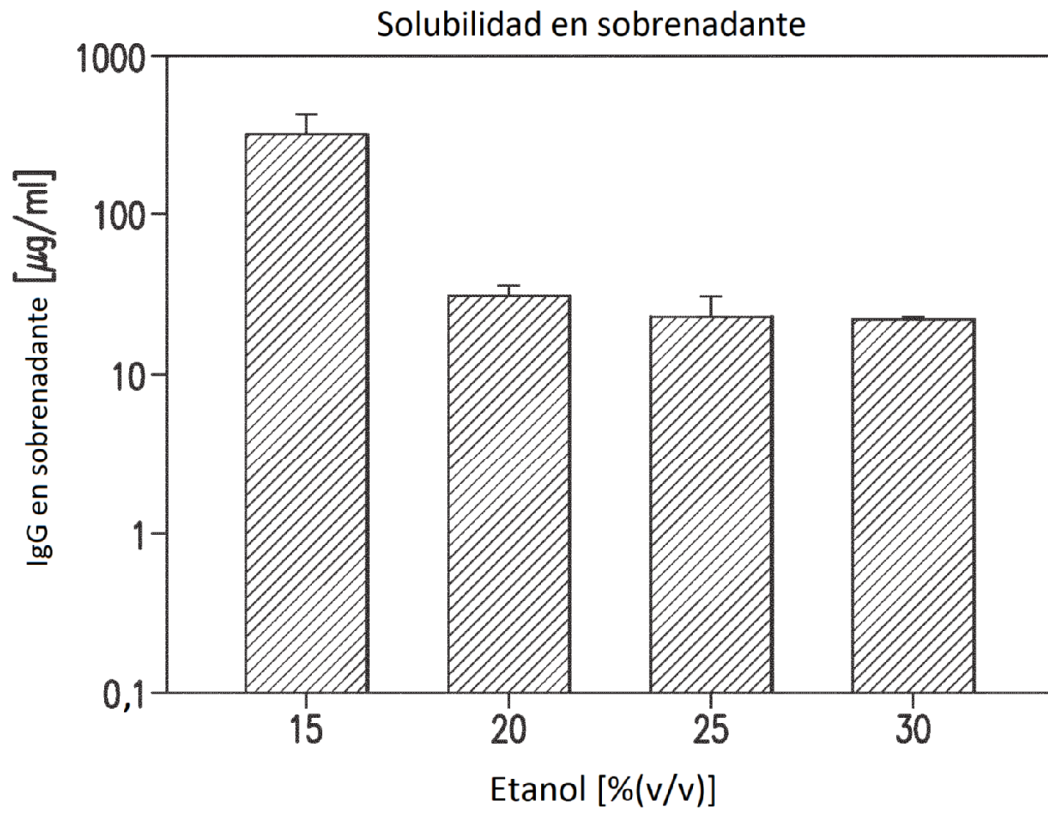


FIG.14A



**FIG.14B**





**FIG. 15A**

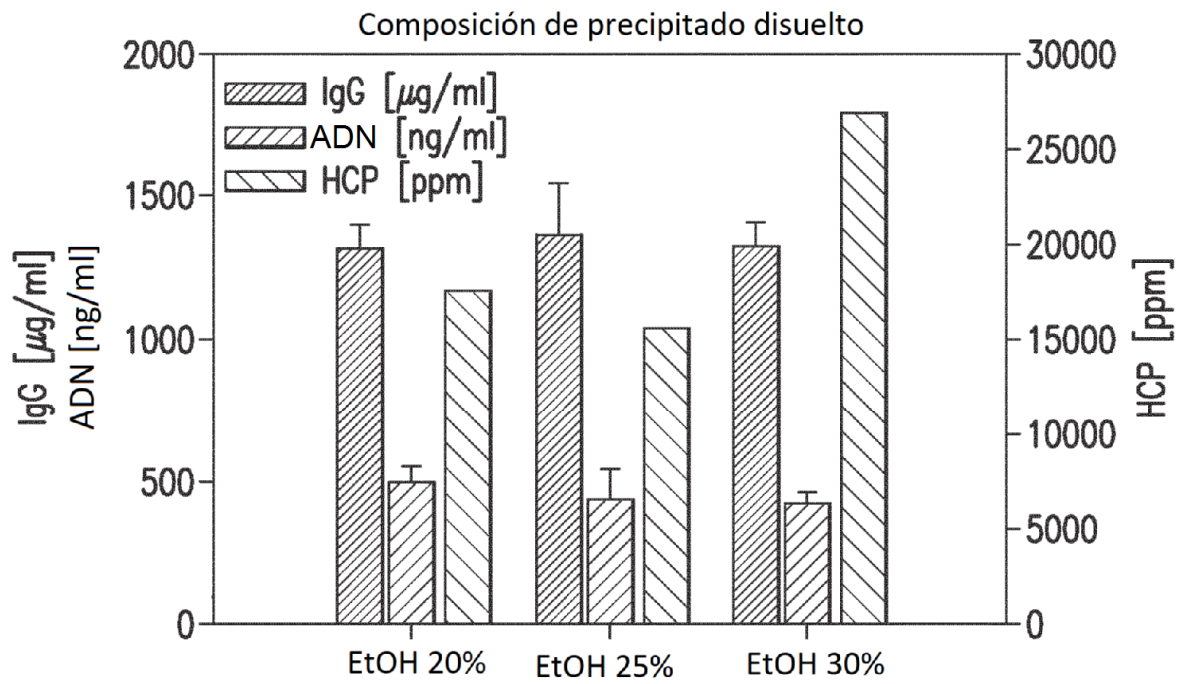


FIG.15B

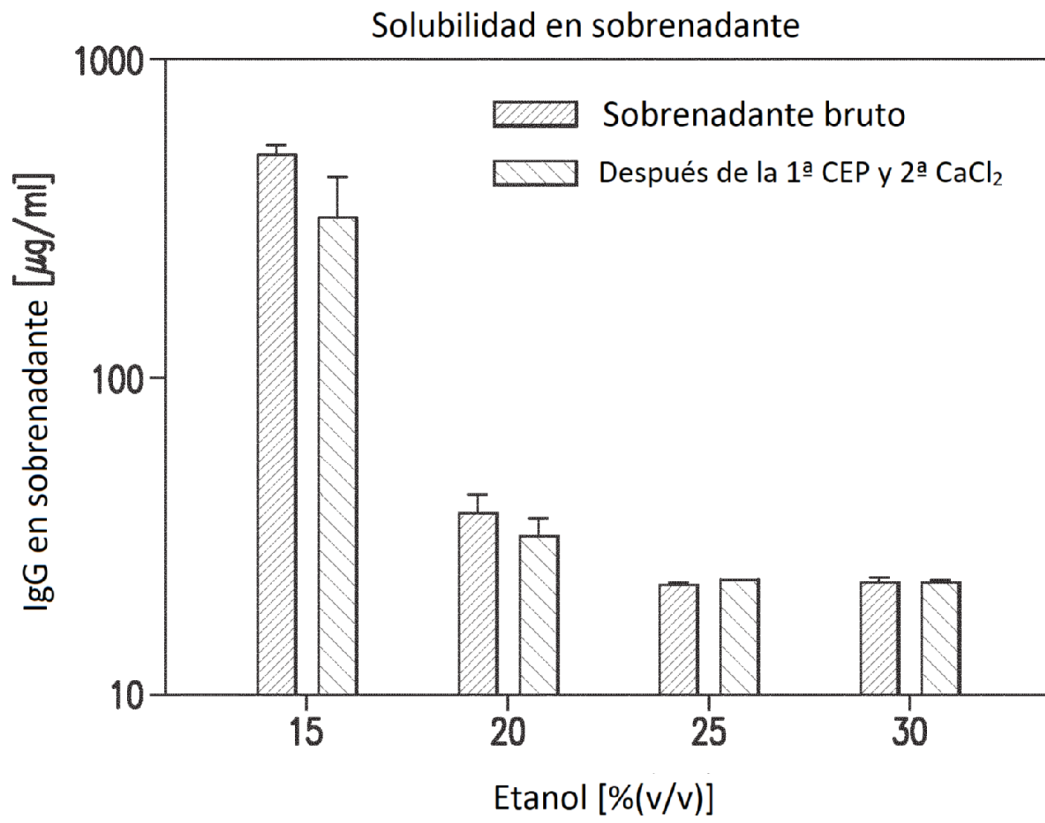


FIG. 16A

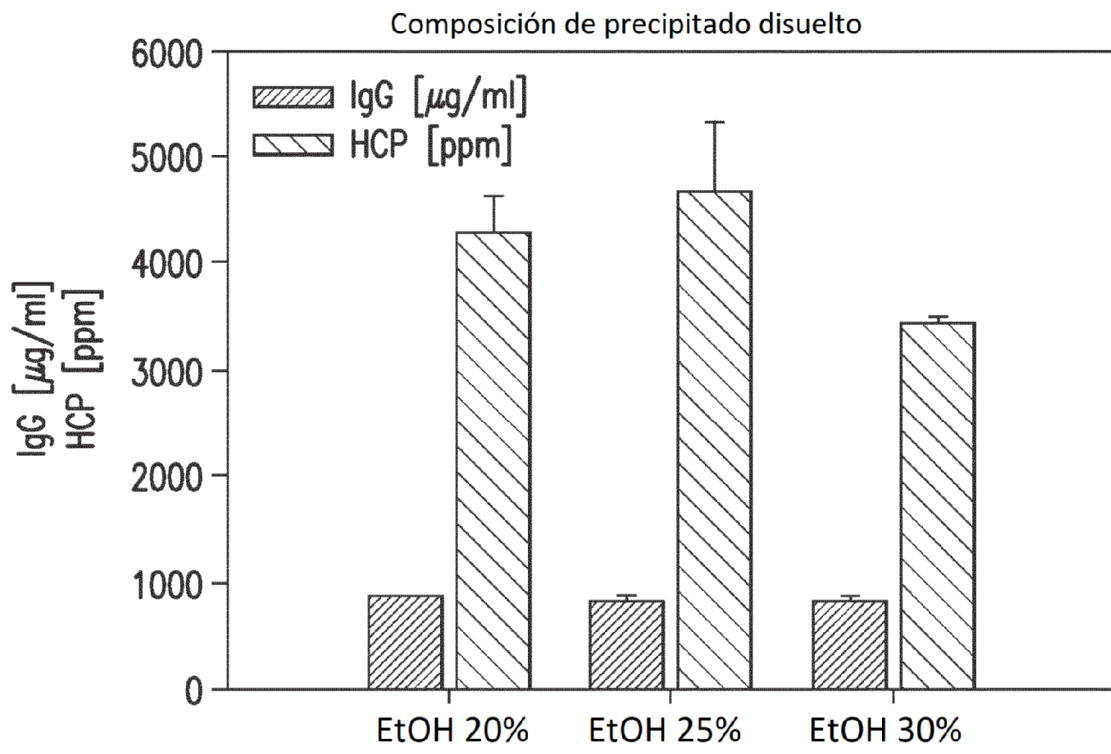


FIG. 16B

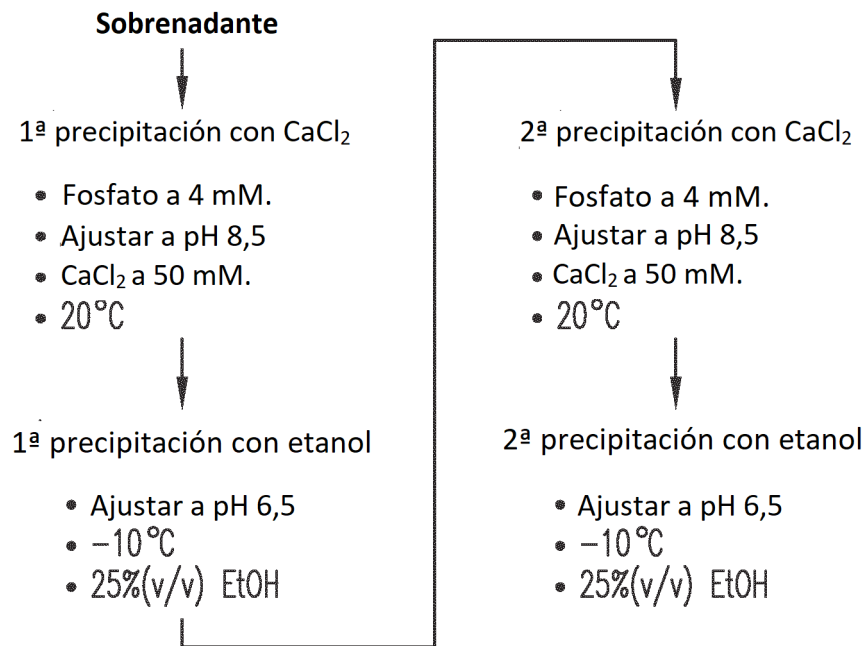


FIG.17

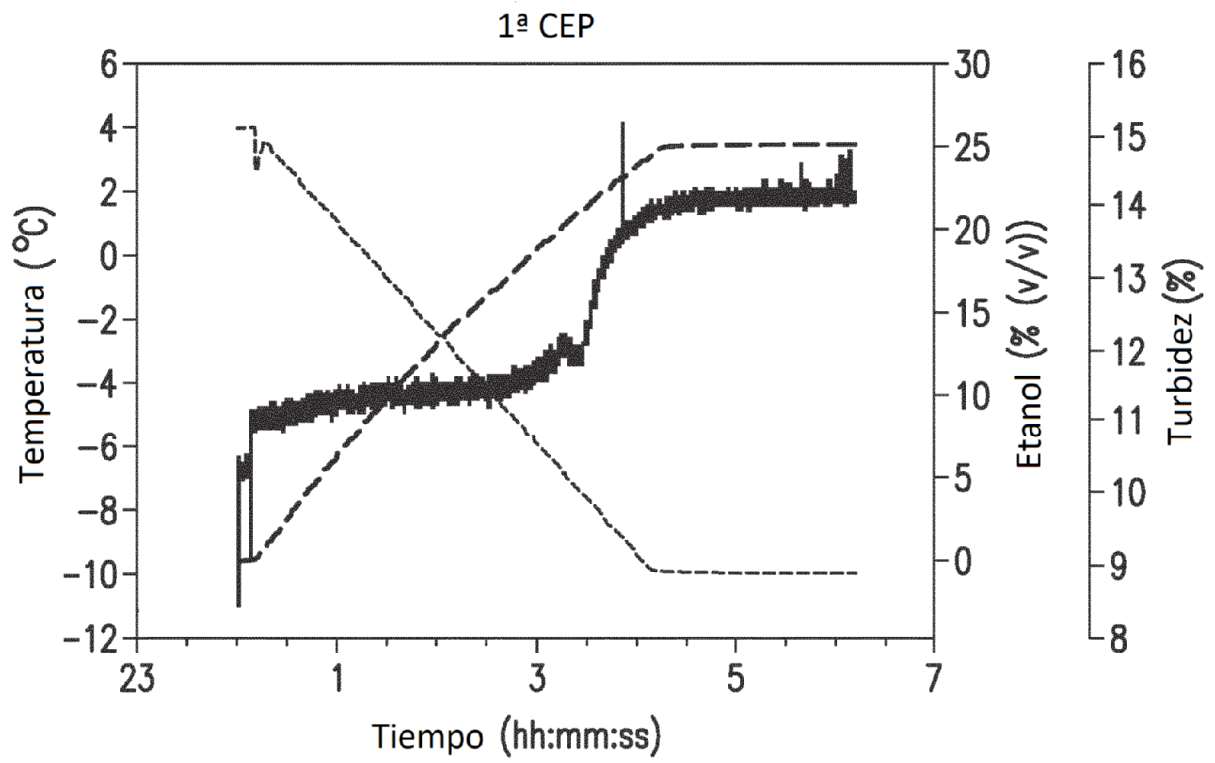


FIG.18A

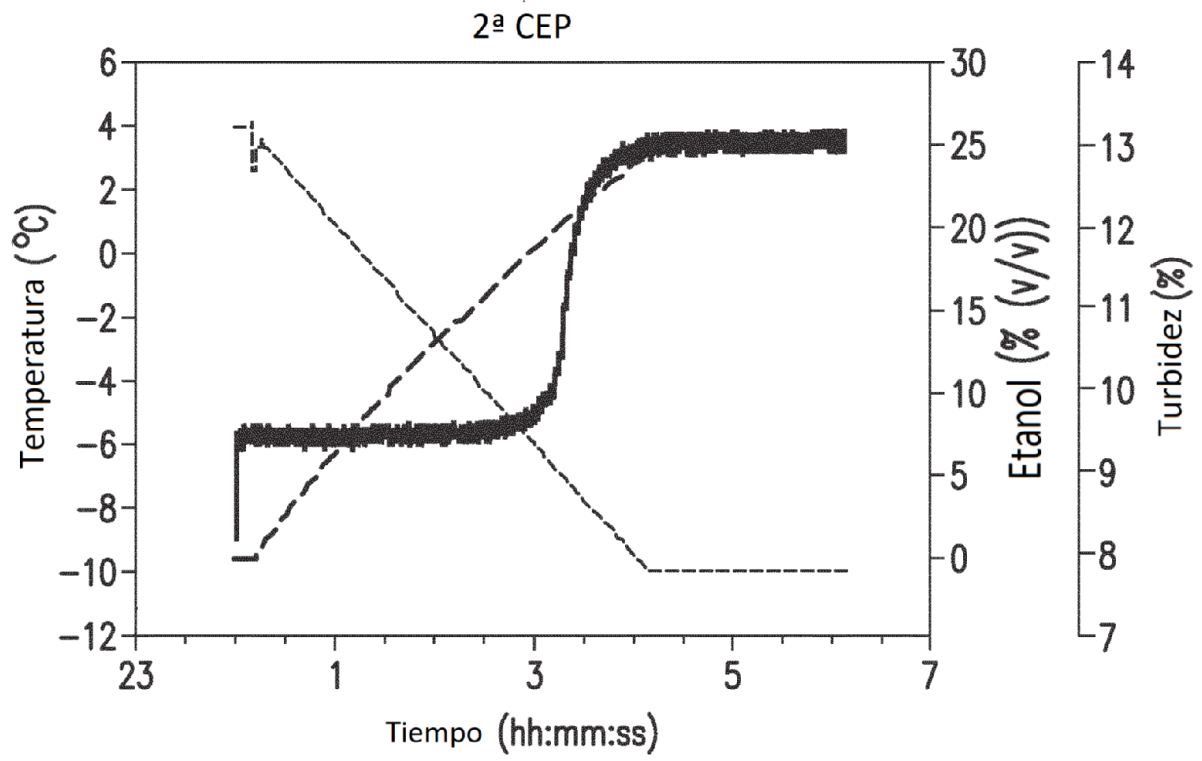
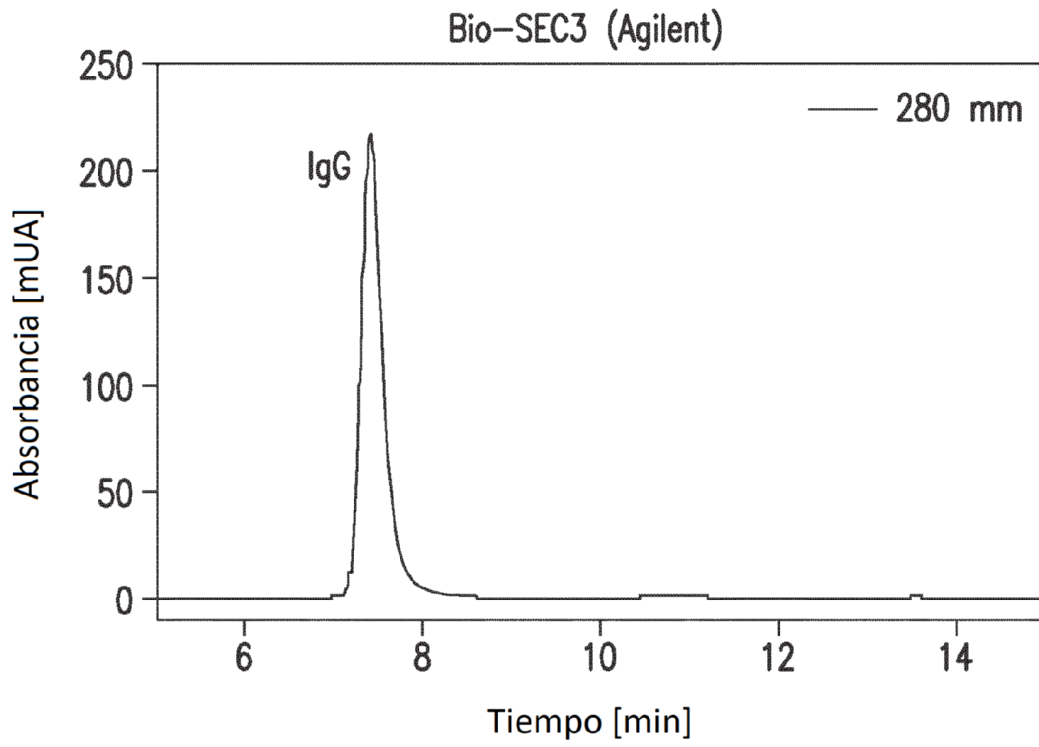


FIG.18B



**FIG. 19A**



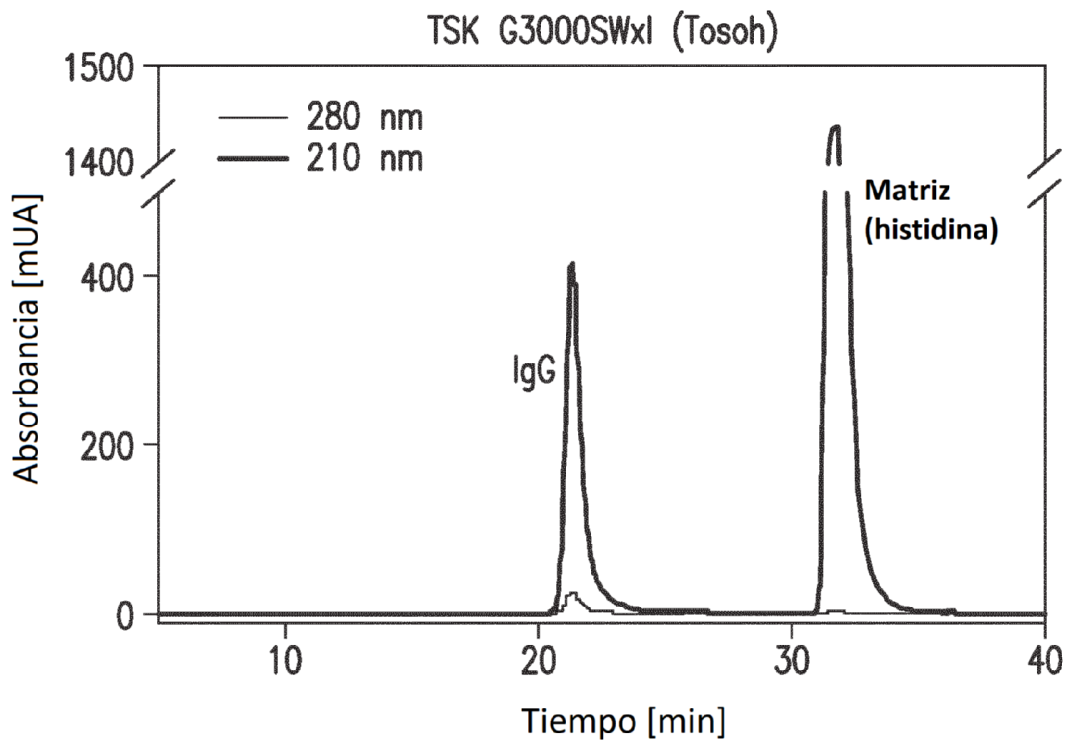
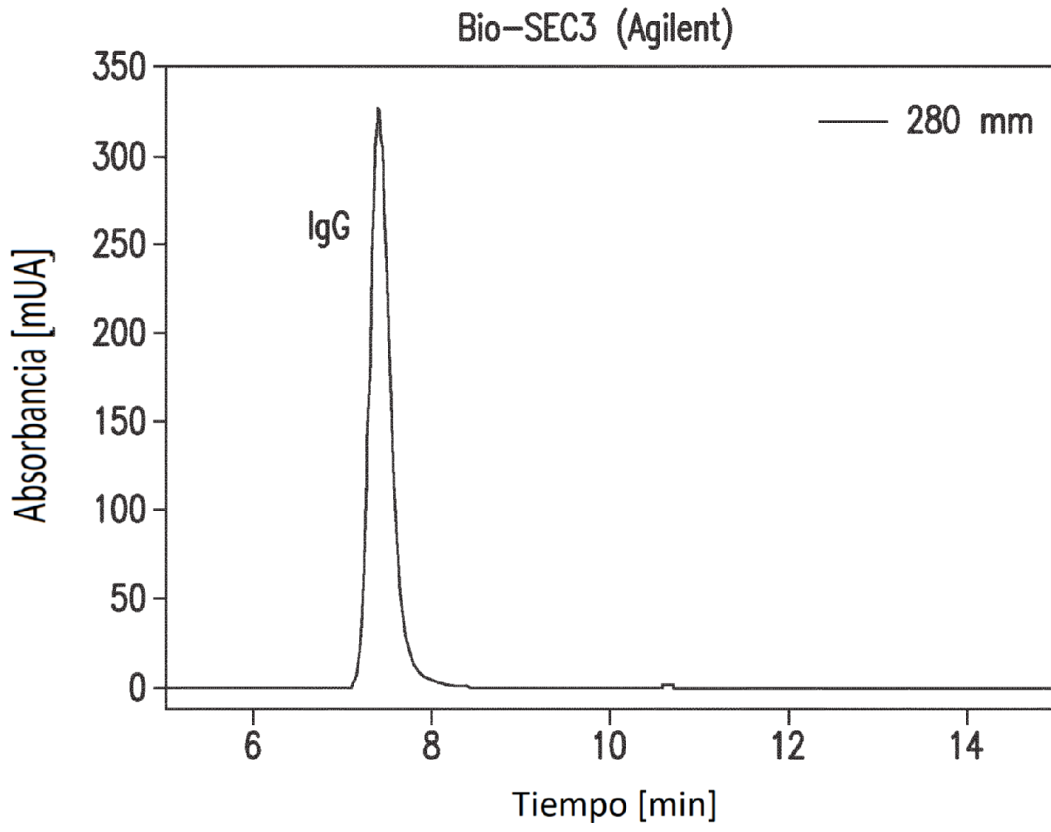


FIG. 19B



**FIG.20A**

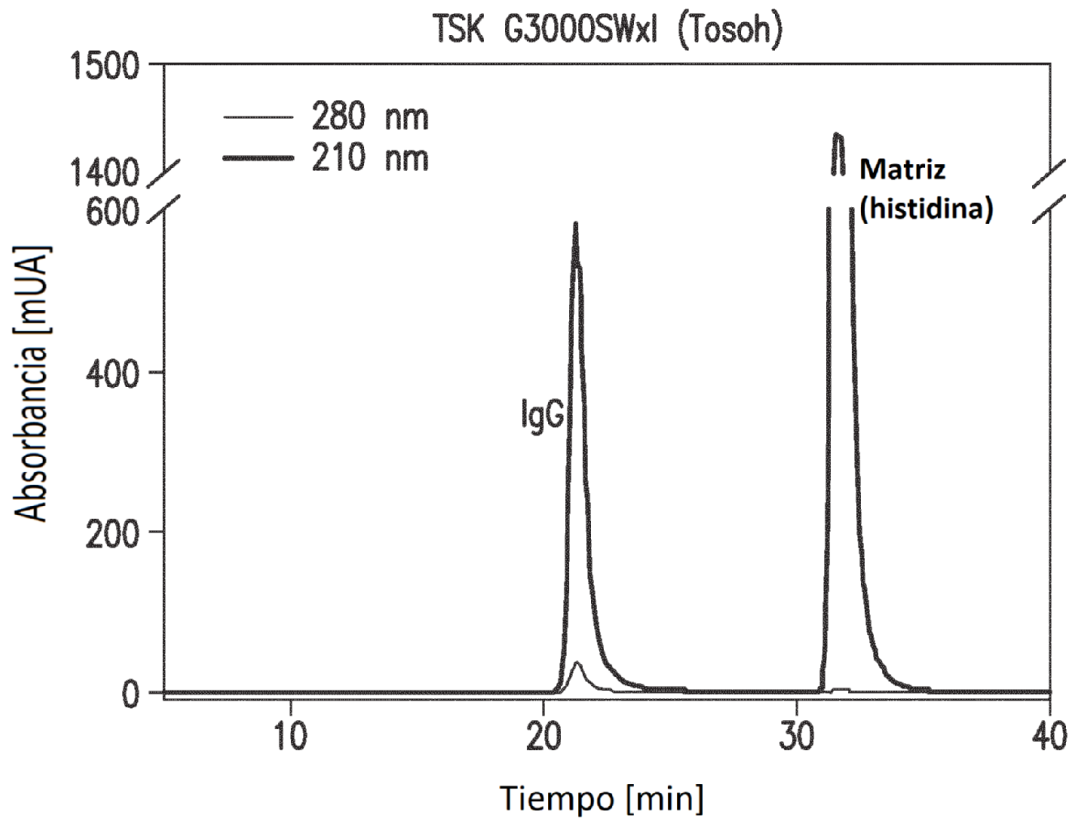
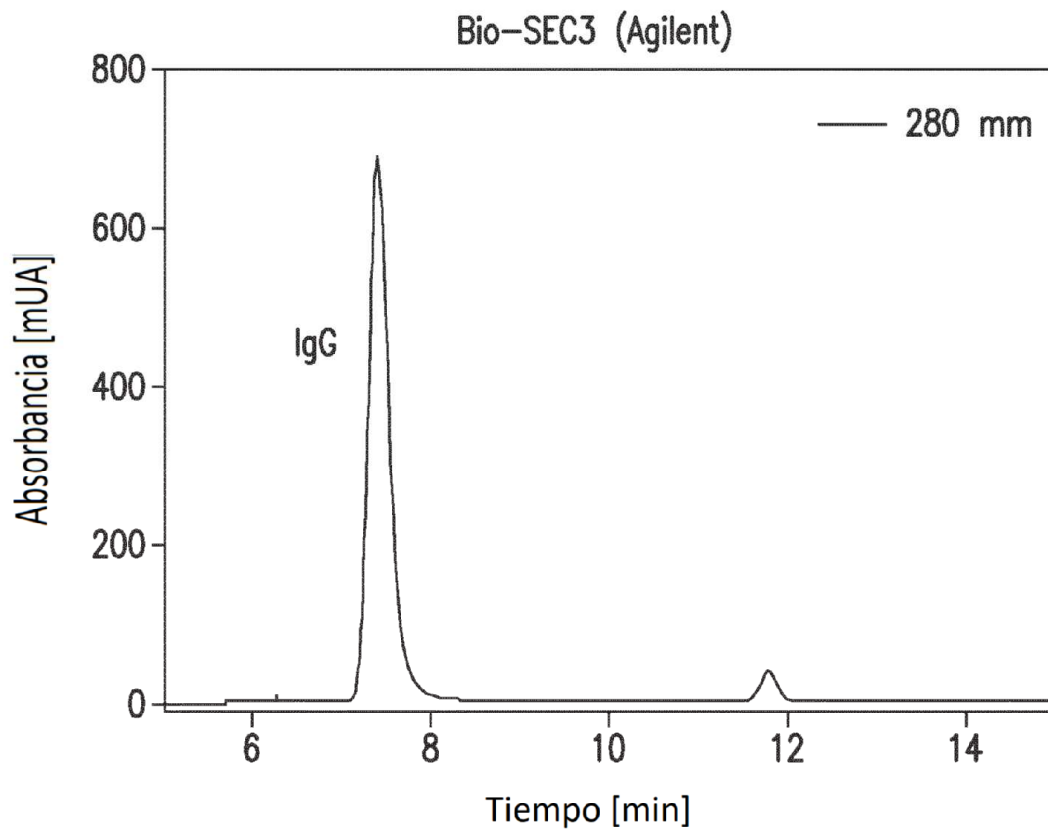
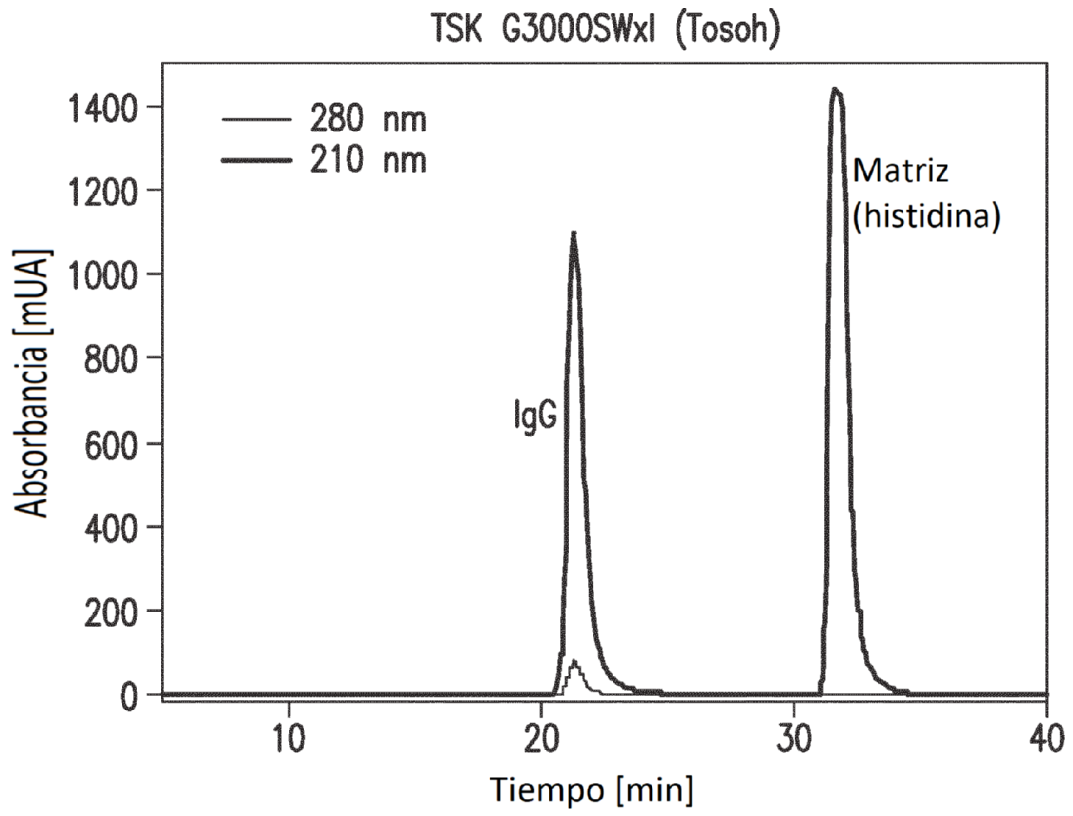


FIG.20B



**FIG.21A**



**FIG.21B**

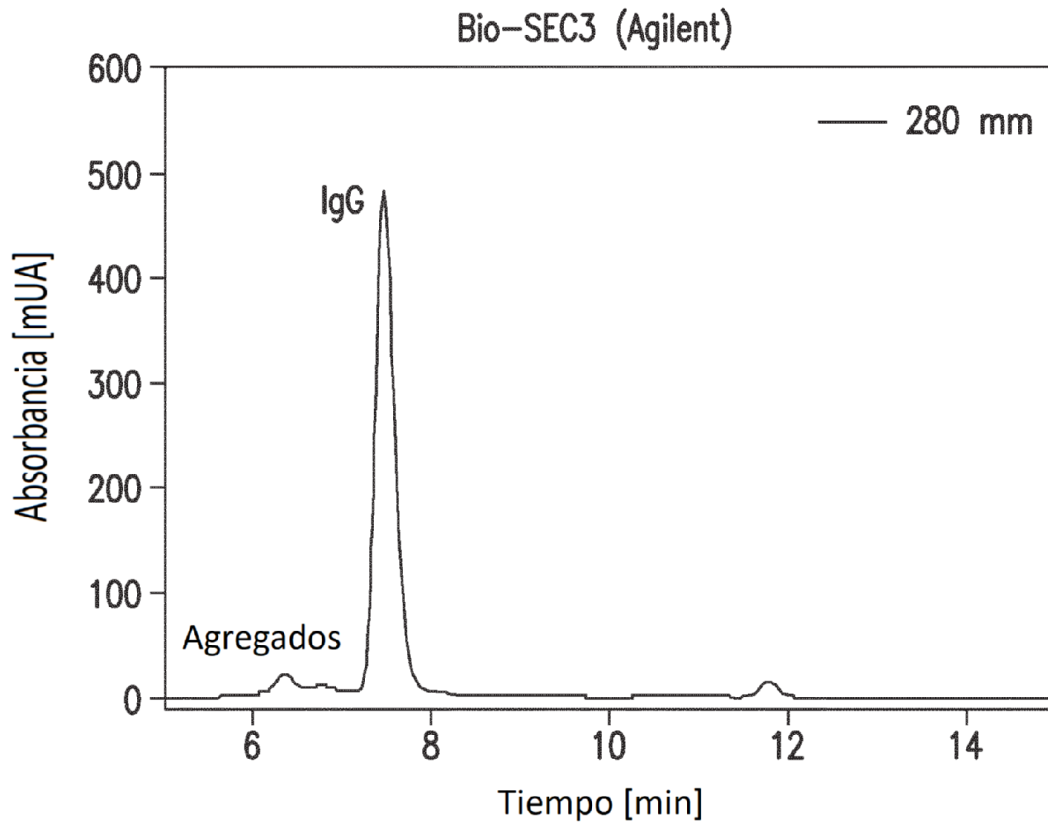


FIG.22A

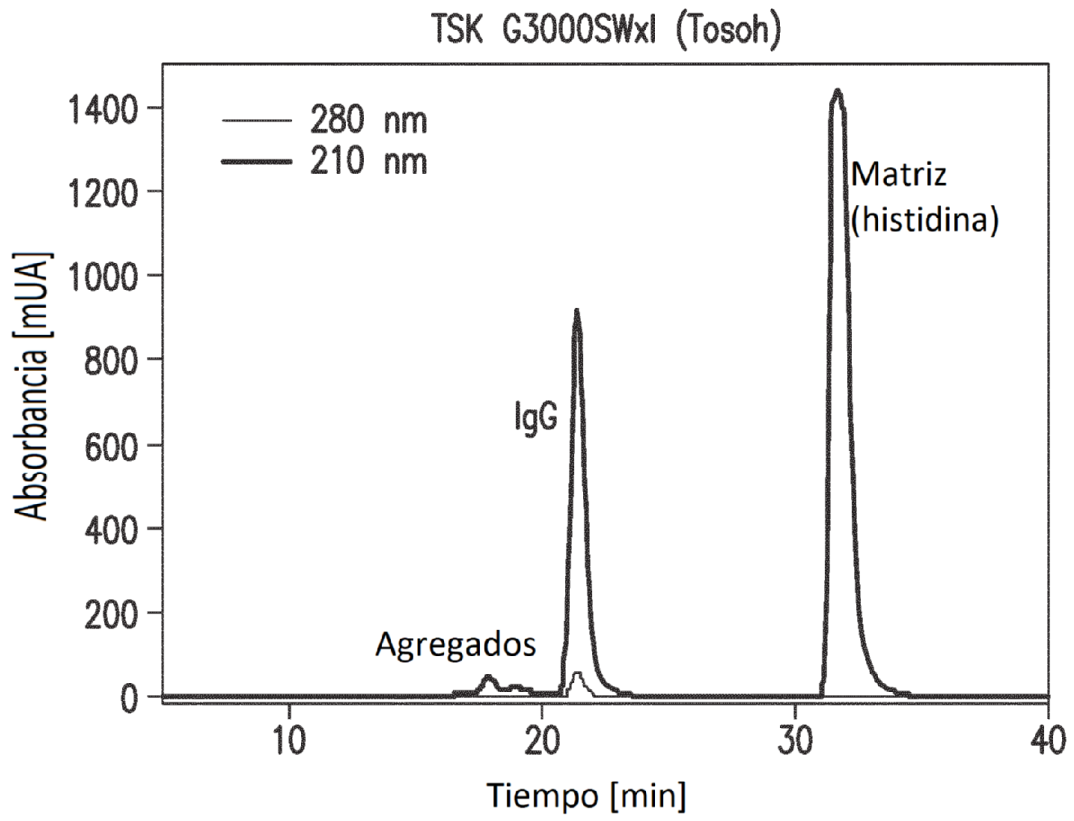


FIG.22B

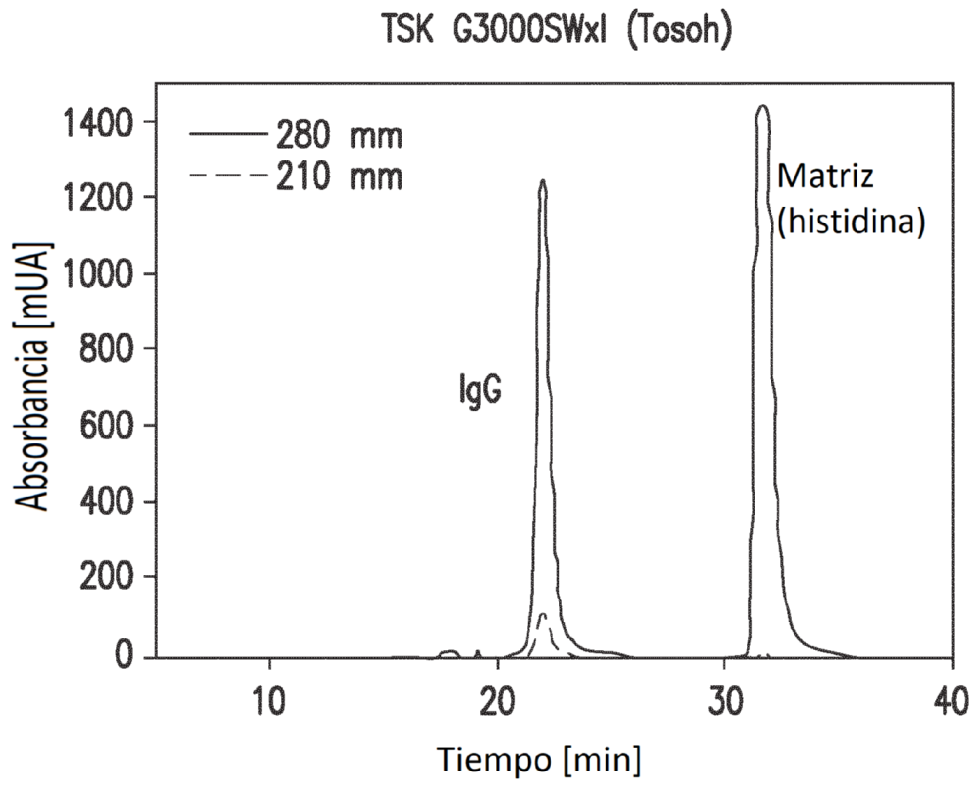


FIG.23



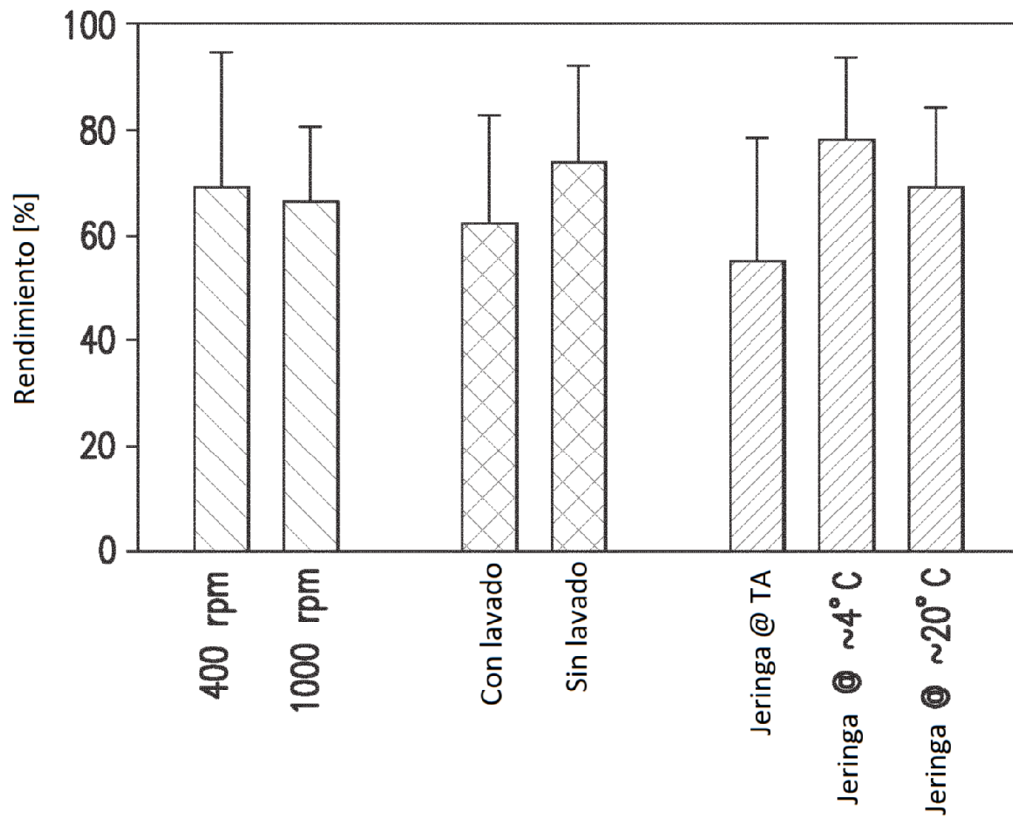


FIG.24

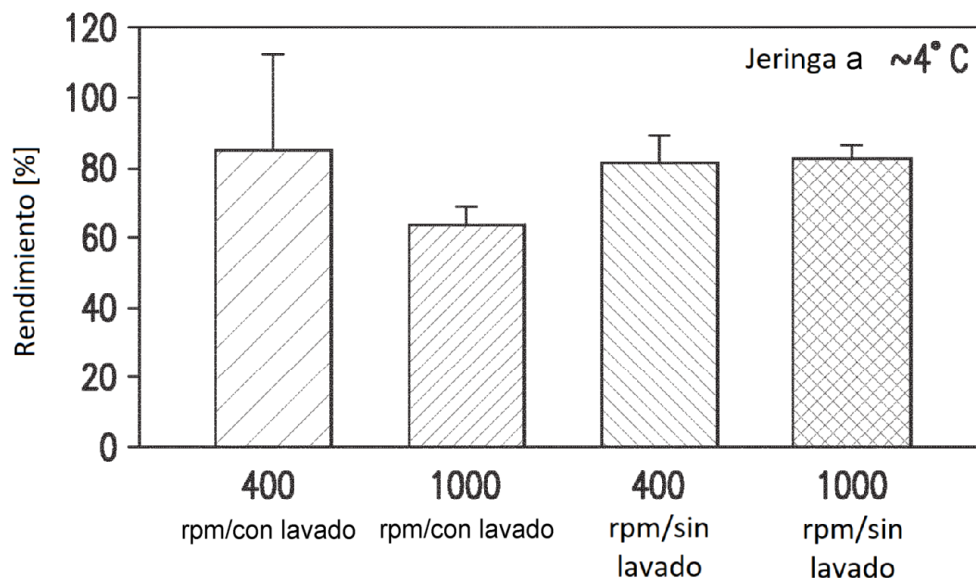


FIG.25

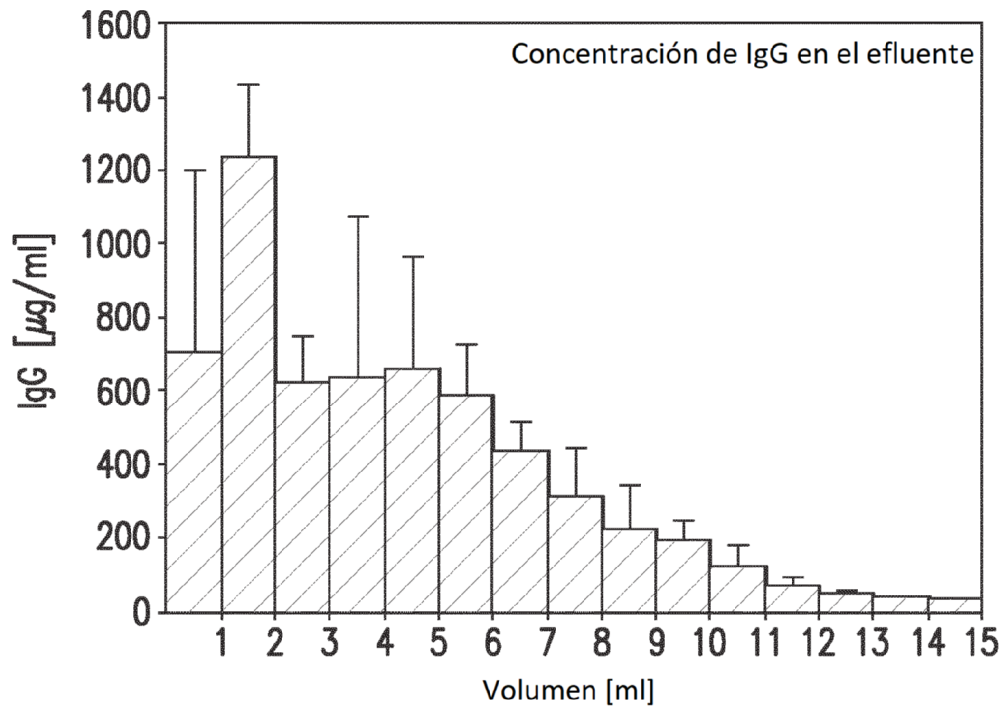


FIG.26A

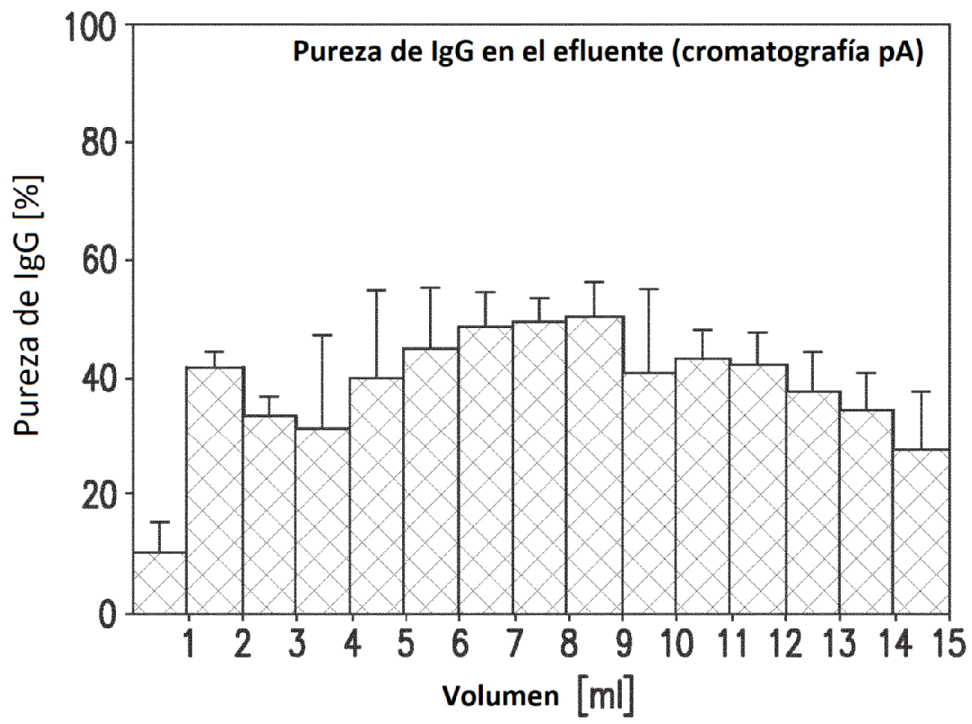
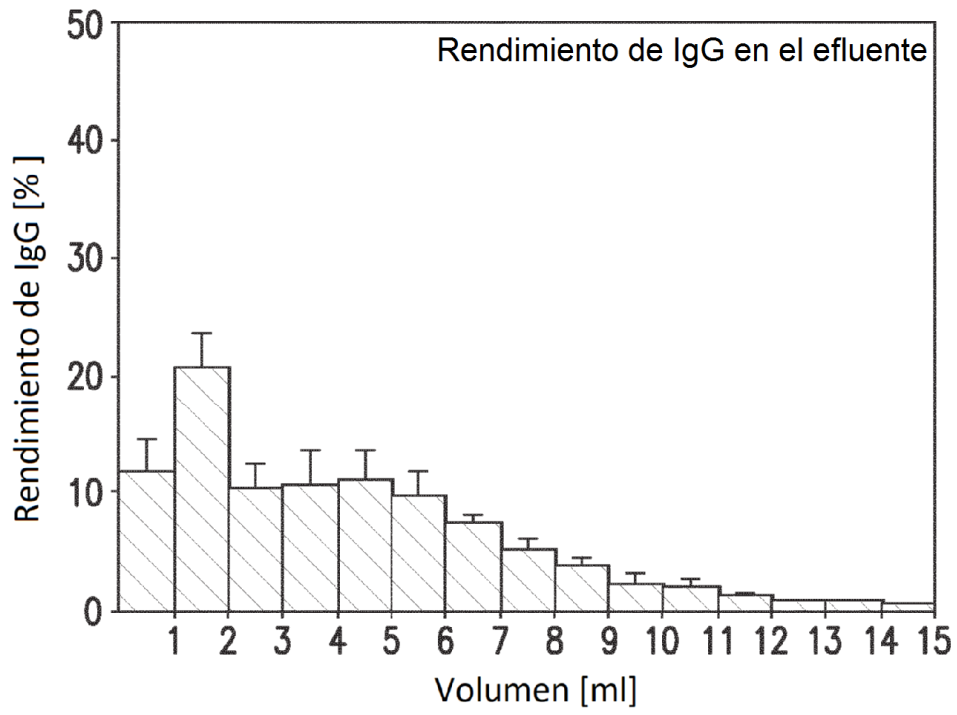


FIG.26B



**FIG.26C**

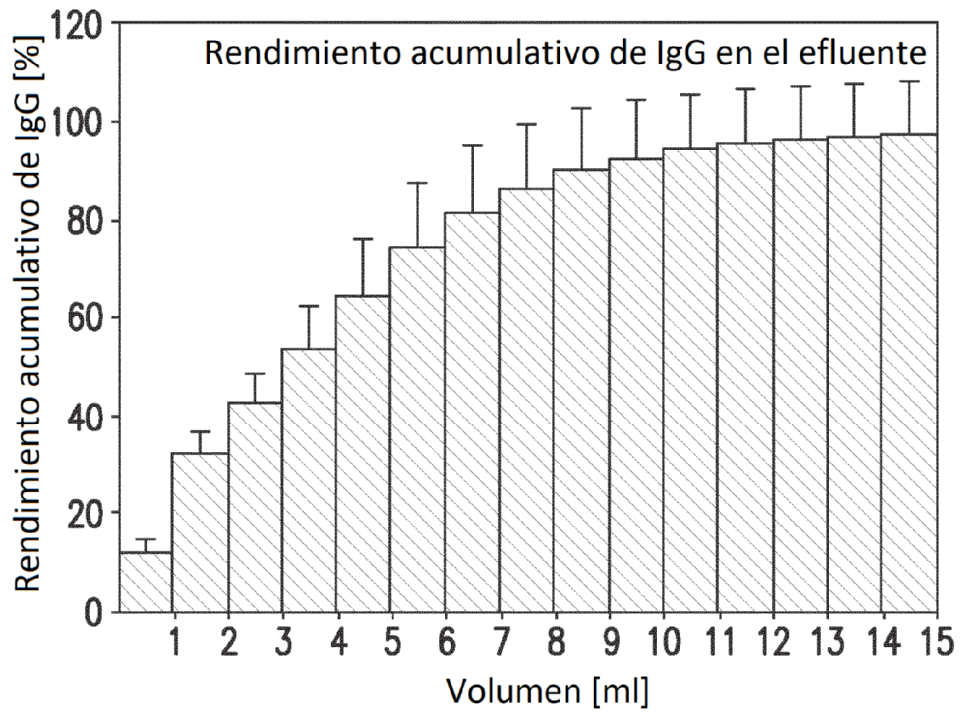


FIG.26D

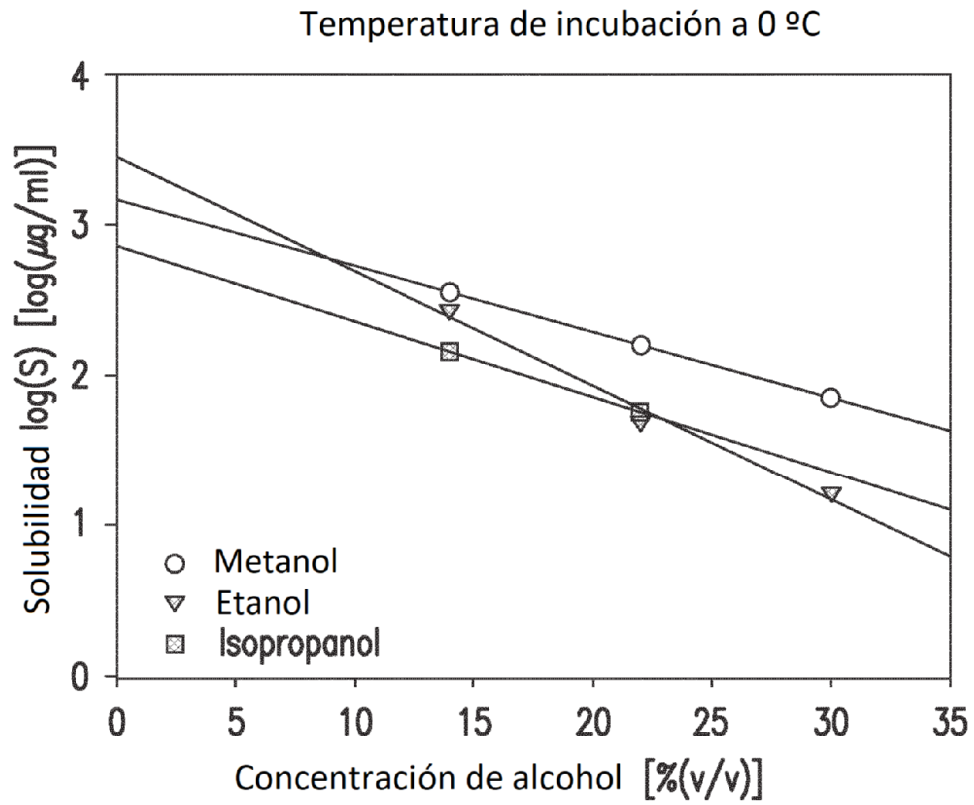


FIG.27A

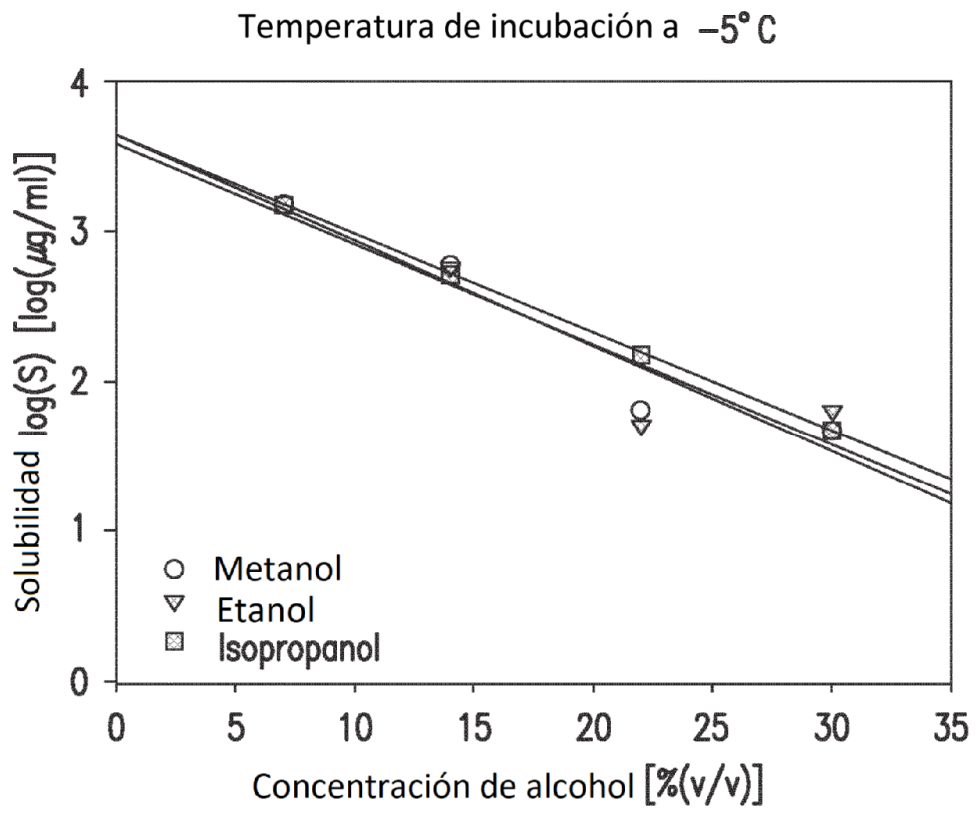


FIG.27B



Temperatura de incubación a 0 °C

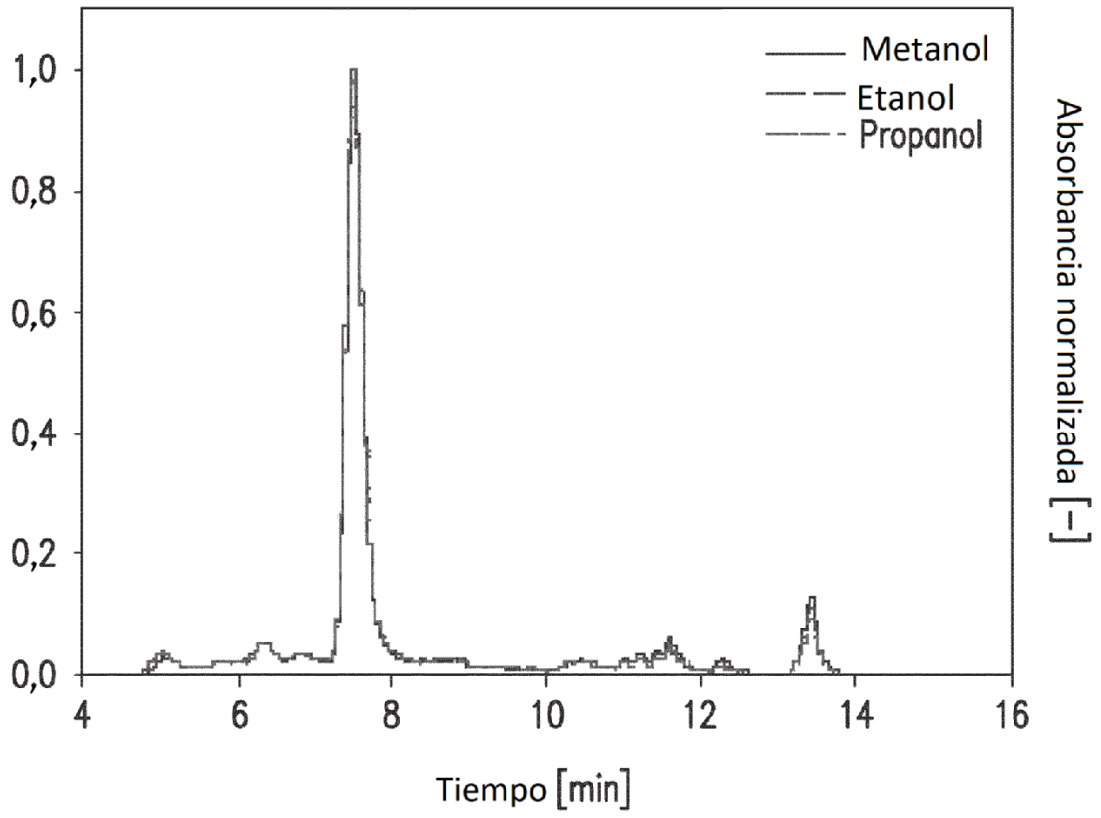


FIG.28A

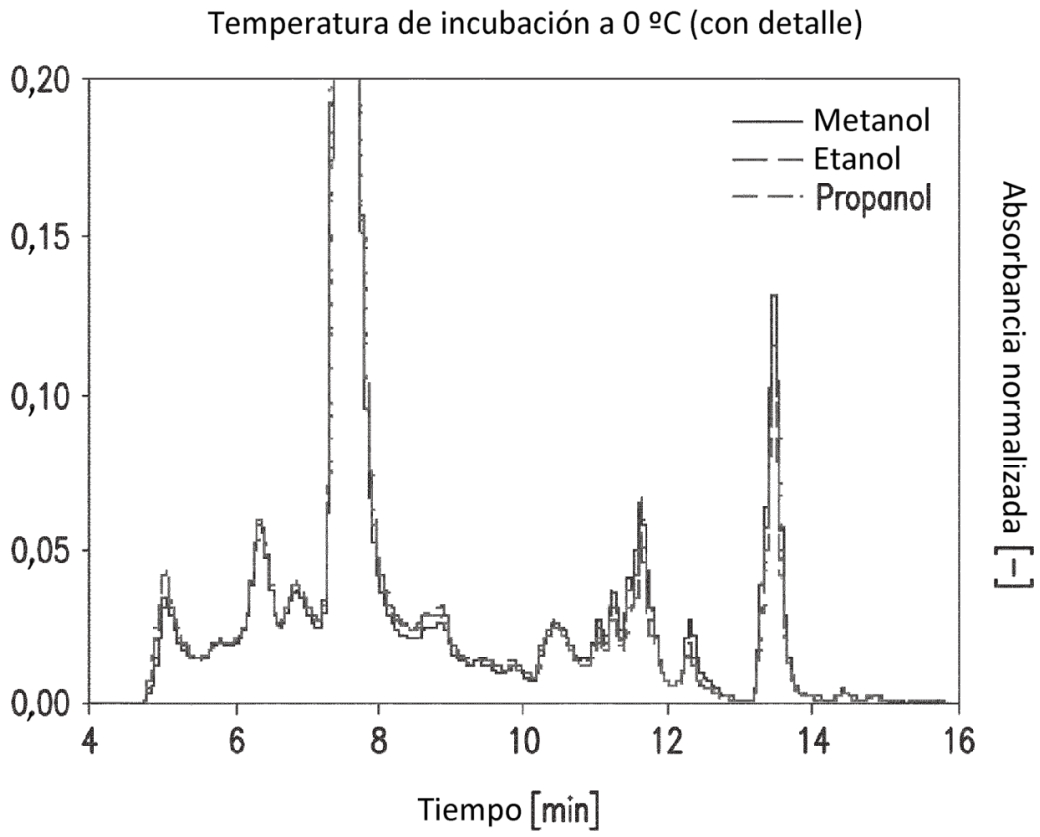


FIG.28B

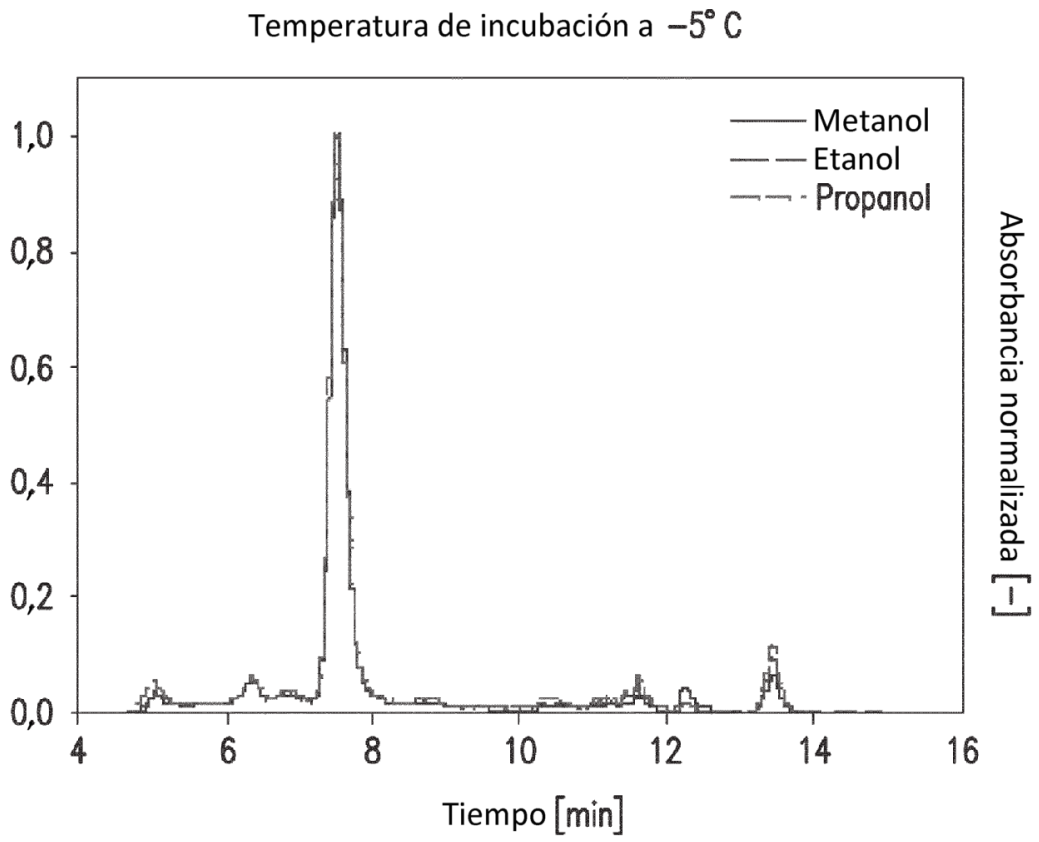


FIG.28C

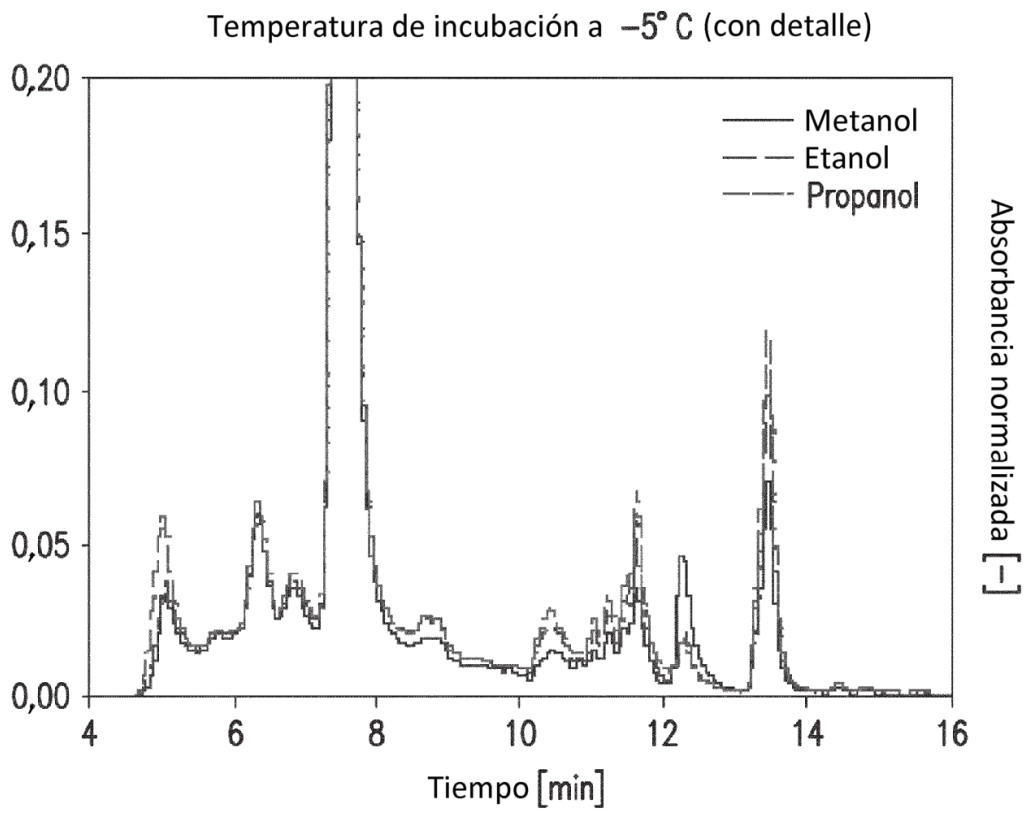


FIG.28D

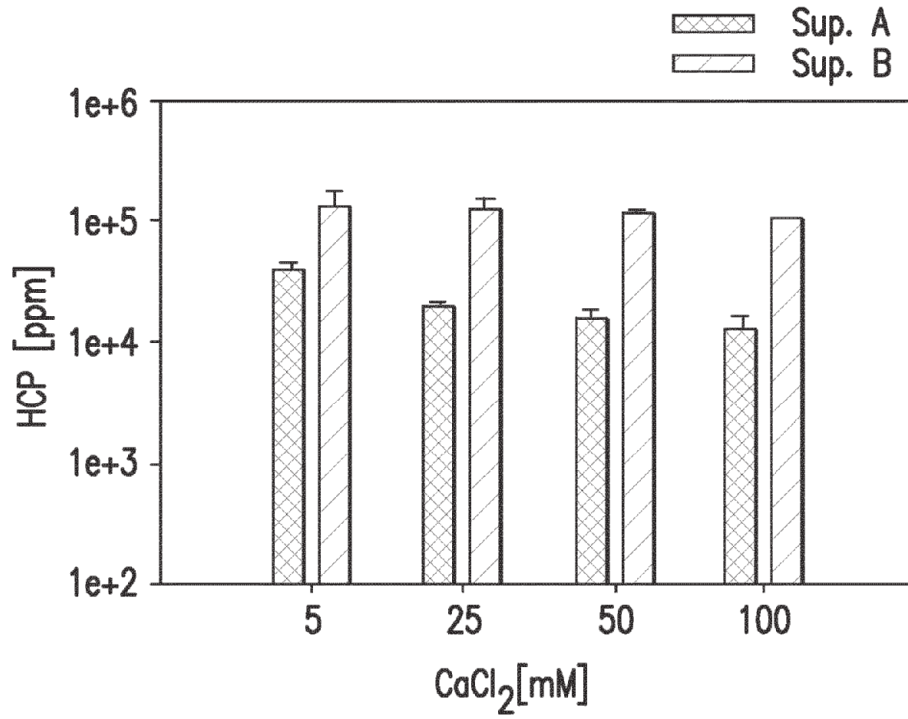


FIG.29A

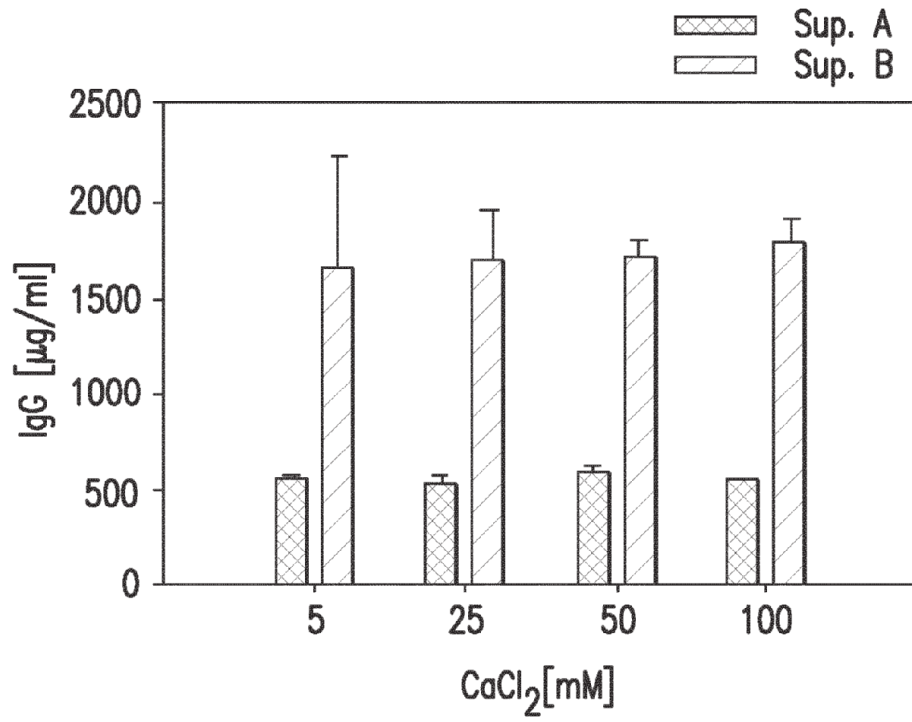


FIG.29B

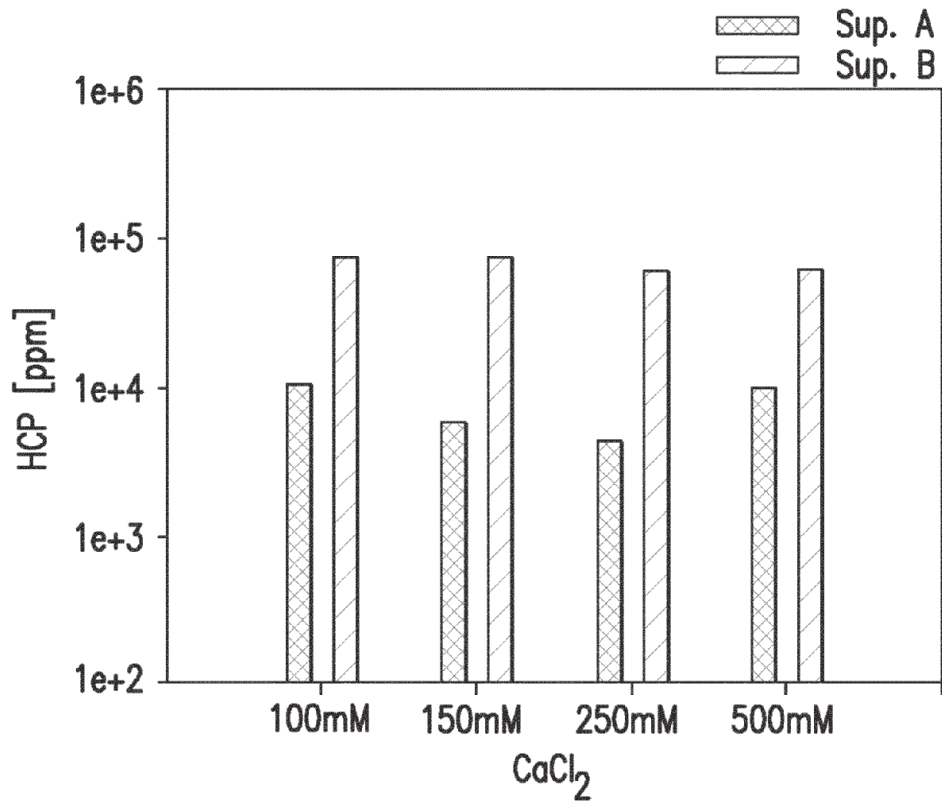


FIG.30A

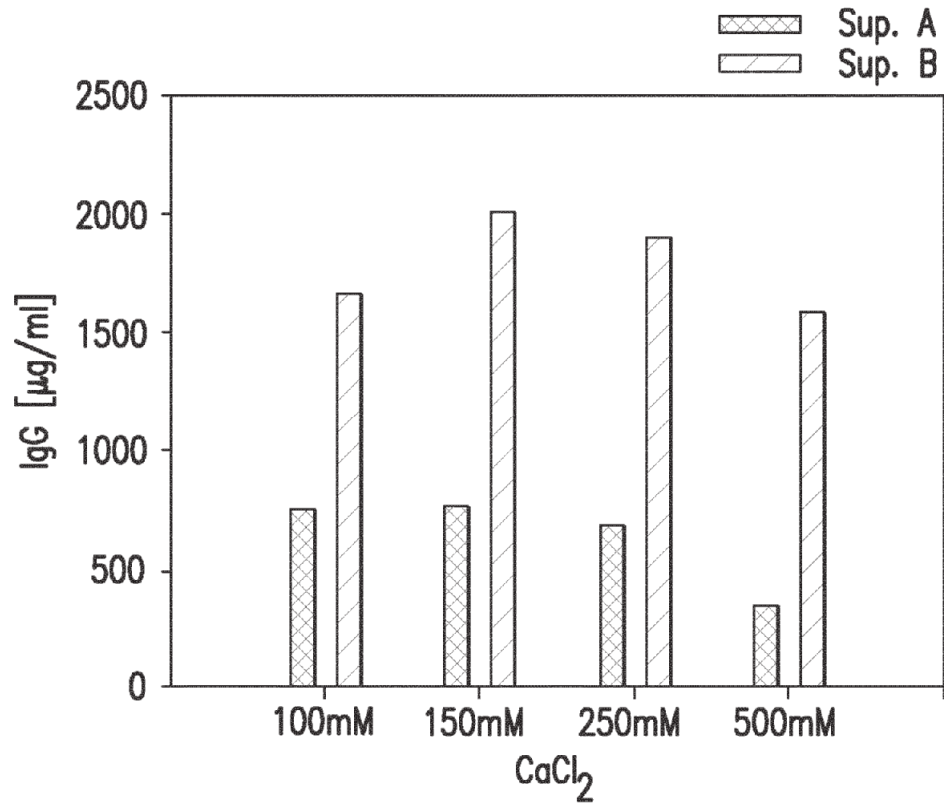


FIG.30B



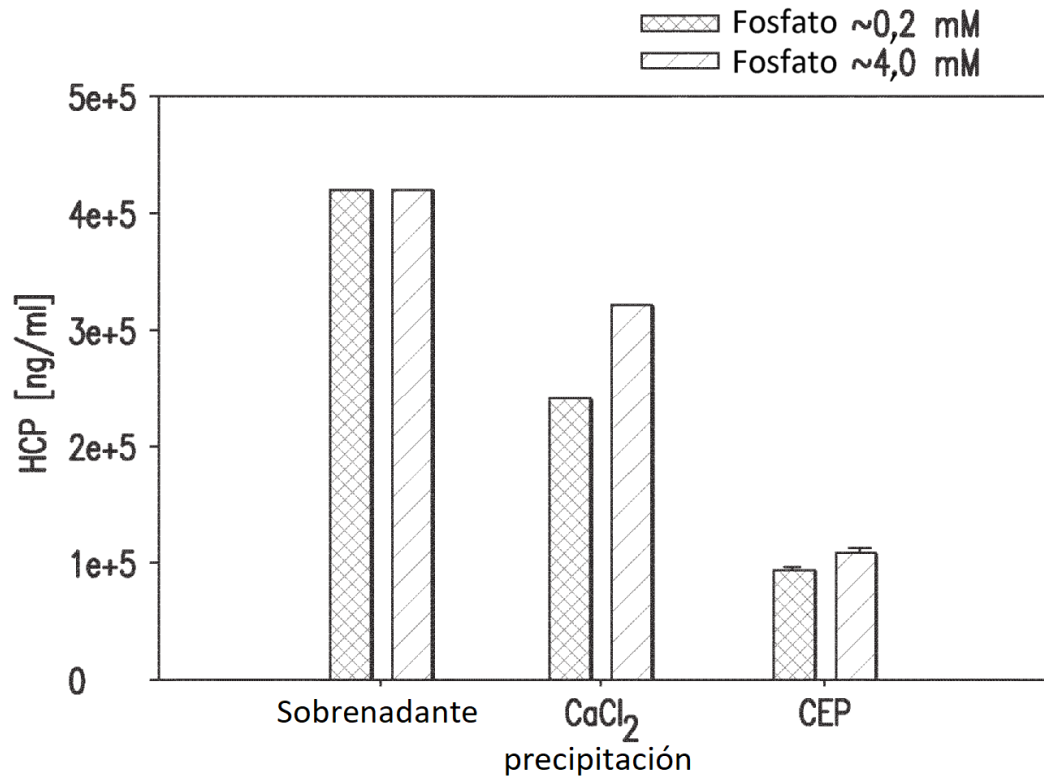


FIG.31

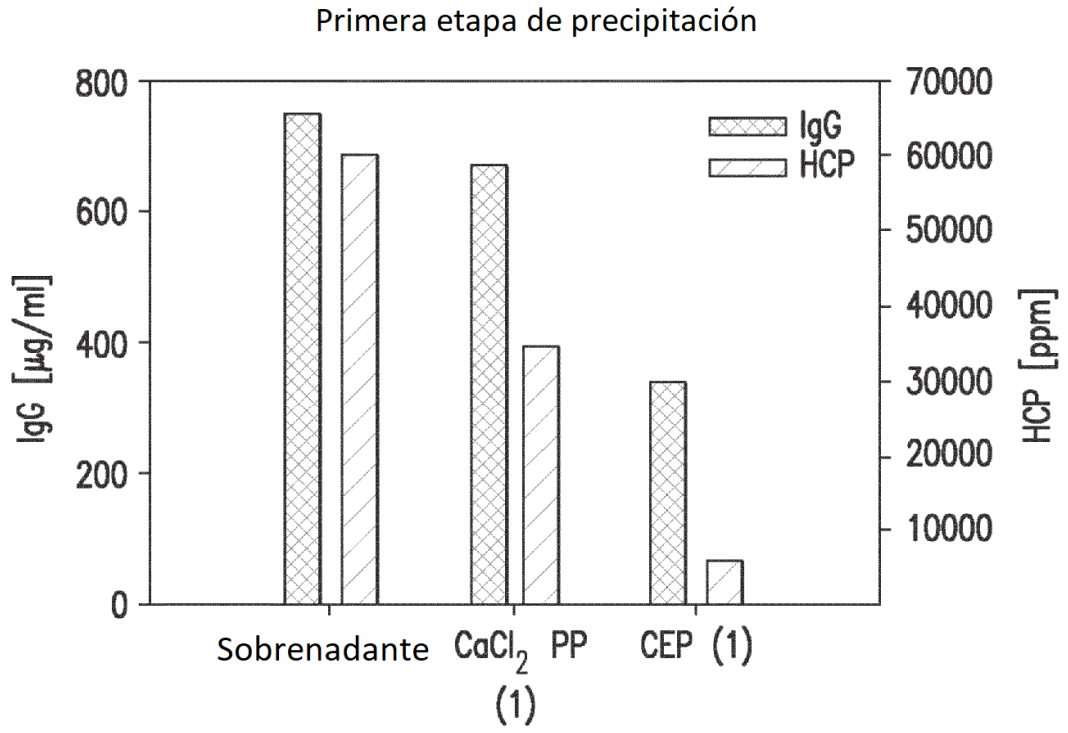


FIG.32A

Segunda etapa de precipitación usando precipitación con  $\text{CaCl}_2$  -fosfato

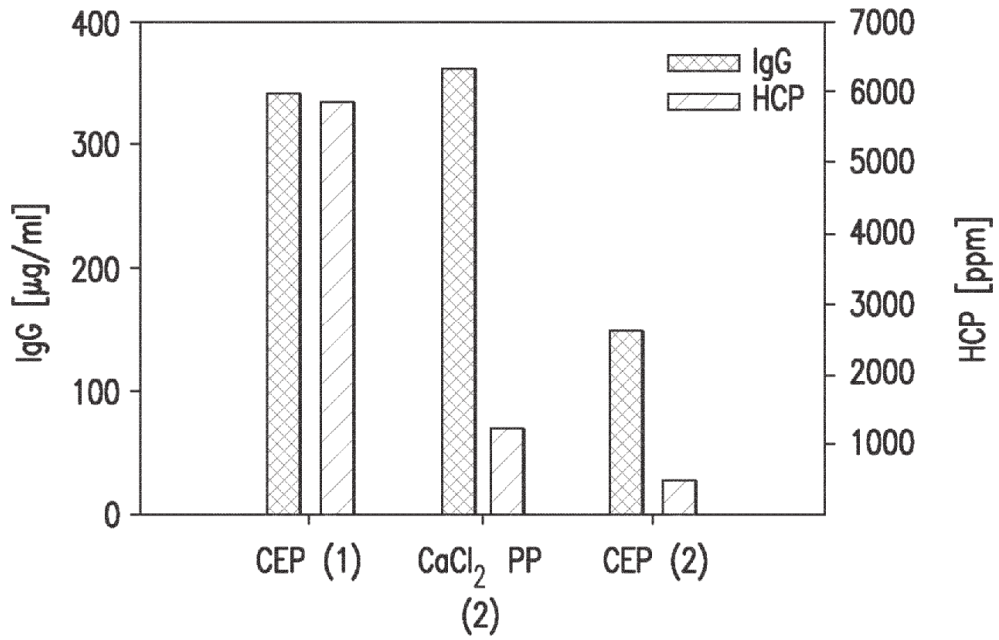


FIG.32B

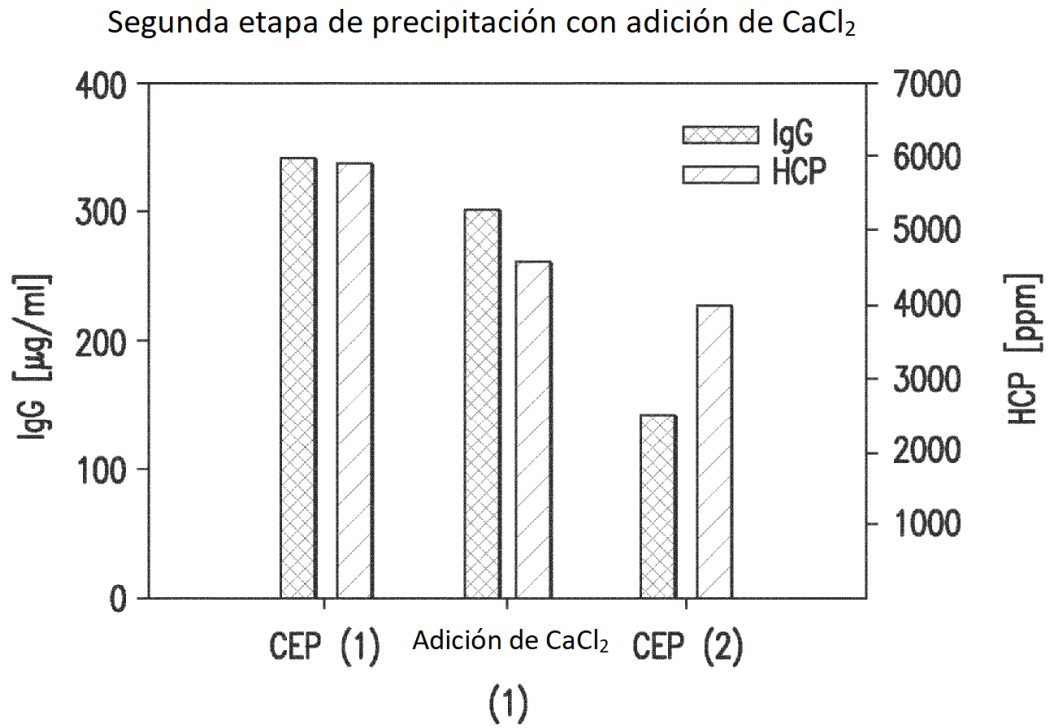


FIG.32C

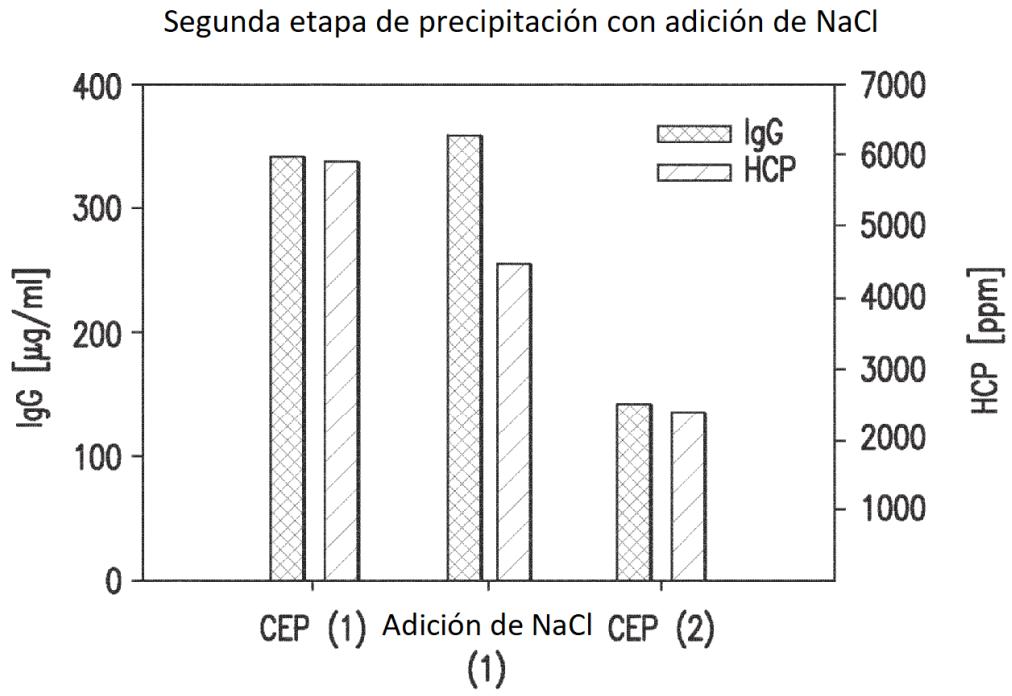


FIG.32D